



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEX DA SILVA BOCALETI

**NOVOS FORMULADOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis*
SUBESP. *israelensis* PARA CONTROLE DE CULICIDAE
(DIPTERA)**

Londrina
2020

ALEX DA SILVA BOCALETI

**NOVOS FORMULADOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis*
SUBESP. *israelensis* PARA CONTROLE DE CULICIDAE
(DIPTERA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi
Coorientadora: Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bocaleti, Alex da Silva.

Novos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* para controle de Culicidae (Diptera) / Alex da Silva Bocaleti. - Londrina, 2020.
65 f. : il.

Orientador: João Antonio Cyrino Zequi.

Coorientador: Gislayne Fernandes Leme Trindade Vilas-Bôas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Mosquitos - Tese. 2. Controle biológico - Tese. 3. Bioinseticida - Tese. 4. Zoologia aplicada - Tese. I. Zequi, João Antonio Cyrino . II. Vilas-Bôas, Gislayne Fernandes Leme Trindade . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

ALEX DA SILVA BOCALETI

**NOVOS FORMULADOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* SUBESP.
israelensis PARA CONTROLE DE CULICIDAE (DIPTERA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gislayne F. L. T. Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 19 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi, meu orientador que me acompanhou desde minha graduação, onde me abriu as portas do laboratório e da Entomologia, onde orientou e guiou efetivamente no ambiente acadêmico e seguirá sendo inspiração como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. Gislayne Fernandes Leme Trindade Vilas-Boas, minha coorientadora, que me apresentou e muito me ensinou e apoiou dentro de uma nova área, sempre me acalmou e segurou nossos pés no chão, até nos momentos mais turbulentos no desenvolvimento dessa dissertação.

À banca, professores que muito me ensinaram e fizeram parte do meu desenvolvimento como biólogo e como pessoa. Todos tiveram um impacto neste trabalho, mesmo involuntariamente.

À equipe do Laboratório de Entomologia Geral e Médica e do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina que auxiliaram ativamente, estiveram presentes e *in loco*, me ensinando, abrindo seu tempo para ajudar a desenvolver este trabalho. Ao Laboratório de Ecologia Microbiana por abrir espaço no laboratório com o empréstimo de equipamentos essenciais para a execução de etapas chaves.

À equipe do grupo de pesquisa da Universidade Federal do Paraná, liderada pelo Prof. Dr. Mario Antônio Navarro da Silva e Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, por essa parceria.

Sobretudo minha mãe, mulher essa que nunca mediu esforços e apoio para a realização dos meus sonhos, mesmo que isso compreenda abdicar de muitas coisas para si. Agradeço por sempre acreditar em mim mesmo quando nem eu mesmo acreditei.

Aos meus irmãos e sobrinho, que acreditaram em mim, apoiaram e estiveram sempre de braços abertos para os retornos. Minha irmã Rosi, que tão cedo se foi, que mesmo com os infortúnios da vida, sempre impactou e me inspirou com seu sorriso, carinho e profissionalismo, a qual só deu mais força para o desenvolvimento deste trabalho e que acontecimentos tais como sejam cada vez menos frequentes.

Meus amigos, a família que a UEL uniu, que me abraçaram nessa cidade longe da família, que mais me apoiaram presencialmente, ajudaram, abraçaram e levantaram minha cabeça. Sem vocês nada disso teria sido possível, vocês são meus orgulhos e inspiração.

O projeto foi desenvolvido com apoio financeiro do CNPQ na chamada pública 440385/2016-4 CNPq/CAPES/MS-Dedit.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

BOCALETI, Alex da Silva. **Novos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* para controle de Culicidae (Diptera)**. 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Culicidae possui relevância em saúde pela veiculação de patógenos causadores de doenças como dengue, chikungunya, zika, febre amarela, filarioses, encefalites e malária. O monitoramento e posterior controle dos vetores é essencial para a baixa circulação de patógenos. *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti) é uma bactéria produtora de toxinas com ação entomopatogênica específica e relevante em comparação aos inseticidas sintéticos que apresentam reduzida especificidade e elevados níveis de resistência. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficácia de novos formulados à base de Bti para o controle de *Aedes* e *Culex* em condições de laboratório e campo. O fermentado de Bti (cepa BR14) foi preparado sob meio NYSM, centrifugado e liofilizado. O fermentado foi formulado em duas formas: comprimido (BioUEL-C) para pequenos recipientes e em grânulos dispersíveis (BioUEL-GD) para maiores áreas. Para a análise da efetividade dos novos formulados a metodologia aplicada seguiu o protocolo proposto por WHO (2005) para larvicidas bacterianos e o produto padrão para os experimentos foi o Vectobac® WG (Lotes 267-853-PG e 291-325-PG30) em três fases: 1. Estudos laboratoriais com *Aedes*; 2. Ensaio de campo em pequena escala com *Aedes* e *Culex*; 3. Ensaio de campo com *Culex*. As larvas de *Aedes* foram obtidas por meio de armadilhas ovitrampas, no campus da Universidade Estadual de Londrina, e larvas de *Culex* em estação de tratamento de esgoto. Os testes laboratoriais determinaram a toxicidade de 2.700 UTI/mg do formulado BioUEL-C. Nos testes em condições de campo os formulados comerciais não diferiram estatisticamente em relação a mortalidade pelo BioUEL-C e BioUEL-GD, durante sete semanas de persistência, atingindo até a quinta semana mortalidade acima de 90%. Para *Culex* em situação de campo, BioUEL-GD não mostrou diferença significativa com a formulação comercial durante dez semanas de experimento, sendo que somente na sétima semana a taxa de mortalidade foi menor que 90%. Em todas as etapas do experimento em campo os fatores abióticos não tiveram diferenças entre o controle e formulações para pH, oxigênio, condutividade e salinidade. Em campo, com *Culex*, a aplicação do BioUEL-GD obteve eficácia satisfatória de até cinco dias de atividade, obtendo o pico de 94,97% de decréscimo populacional no terceiro dia de aplicação iniciando o reestabelecimento populacional. Os produtos foram eficazes para o controle de *Aedes* e *Culex*, sem alterar os fatores abióticos sendo efetiva para ações de redução da densidade de vetores com reduzido impacto na fauna a partir da vantagem de sua seletividade.

Palavras-chave: Mosquitos. Controle Biológico. Bioinseticida. Zoologia Aplicada.

BOCALETI, Alex da Silva. **Novos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para controle de Culicidae (Diptera)**. 2019. 63 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019,

ABSTRACT

Culicidae has relevance in health by the transmission of pathogens that cause diseases such as dengue, chikungunya, zika, yellow fever, filariasis, encephalitis and malaria. Monitoring and subsequent control of vectors is essential for the low circulation of pathogens. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) is a toxin-producing bacterium with specific and relevant entomopathogenic action compared to synthetic insecticides that have reduced specificity and high levels of resistance. This work aims to evaluate the effectiveness of new formulations Bti-based for the control of *Aedes* and *Culex* genera in laboratory and field conditions. The Bti fermentate (BR14 strain) was prepared in NYSM medium, centrifuged and lyophilized. The fermentate was formulated in two forms: tablets (BioUEL-C) for small containers and dispersible granules (BioUEL-GD) for larger areas. For the analysis of the effectiveness of the new formulations, the methodology applied follows the protocol proposed by WHO (2005) for bacterial larvicides and the standard product for the experiments was Vectobac® WG (Lots 267-853-PG and 291-325-PG30) in three phases: 1. Laboratory studies with *Aedes*; 2. Small-scale field trials with *Aedes* and *Culex*; 3. Field trials with *Culex*. *Aedes* larvae were obtained using ovitraps, on the campus of the State University of Londrina, and *Culex* larvae in a sewage treatment station. Laboratory tests determined the toxicity of 2,700 ICU/mg of the formulated BioUEL-C. In tests under field conditions, commercial formulations didn't differ statistically in relation to mortality by BioUEL-C and BioUEL-GD, during seven weeks of persistence, reaching mortality up to 90% by the fifth week. For *Culex* in a field situation, BioUEL-GD showed no significant difference with the commercial formulation during ten weeks of the experiment, and only in the seventh week the mortality rate was less than 90%. In all stages of the field experiment, abiotic factors did not differ between control and formulations for pH, oxygen, conductivity and salinity. In the field, with *Culex*, the application of BioUEL-GD obtained satisfactory efficacy of up to five days of activity, obtaining a peak of 94.97% of population decrease on the third day of application, starting the population reestablishment. The products were effective for the control of *Aedes* and *Culex*, without changing the abiotic factors, being effective for actions to reduce the density of vectors with reduced impact on the fauna from the advantage of their selectivity.

Key-words: Mosquitos. Biological control. Bioinsecticide. Applied Zoology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Formulado em comprimido BioUEL-C à base de Bti cepa BR14 de massa de 50 mg desenvolvido para recipientes de pequeno porte para o controle larval de *Aedes* com capacidade de liberação instantânea e parte de liberação lenta das proteínas.....26
- Figura 2** – Grânulos dispersíveis em água larvicida formulado à base de Bti com característica de suspensão na água. (A) em placas de Petri em situação de laboratório e (B) em caixas d'água experimentalmente.....27
- Figura 3** – Armadilha ovitrampa para a captura de ovos de *Aedes* em campo dispostas no campus da Universidade Estadual de Londrina durante todo o período de experimentação.....28
- Figura 4** – Bioensaio laboratorial para determinação da toxicidade (UTI/mg) do formulado BioUEL-C com larvas de 3º instar de *Aedes*, cinco repetições em dias distintos mantidos em BOD com condições controladas de 25° C ± 2° C, umidade de 80 ± 5% e fotoperíodo 14 horas/luz.....30
- Figura 5** – Segunda etapa de bioensaio em campo para larvas de *Aedes* com os tratamentos: Controle, Vectobac® WG, e BioUEL-GD com cinco repetições por tratamento realizado entre 15/10/2019 à 06/12/2019 na Universidade Estadual de Londrina.....32
- Figura 6** – Experimento em campo com larvas de *Culex* realizado no período de período de 18/03/2019 à 23/05/2019. (A) parte das caixas d'água do experimento dispostas em uma área do campus da Universidade Estadual de Londrina; (B) coleta das larvas para análise da mortalidade com o auxílio de rede.33
- Figura 7** – Experimento em campo para larvas de *Culex* em lagoa de tratamento de efluentes de empresa de óleo de soja em Cambé-PR no período de 19/10/2019 à 27/10/2019. (A) Área da lagoa de tratamento de efluentes como área de teste. (B) Dispositivo e aplicação do formulado BioUEL-GD. (C) Avaliação de parâmetros abióticos da água com auxílio de multiparâmetros. (D) Coleta de larvas com auxílio de rede.....35

- Figura 8** – Média porcentual da mortalidade das repetições dos tratamentos em relação às semanas decorrentes nos tratamentos: controle, Denguetech® DT, Vectobac® WG e BioUEL-C larvas de *Aedes* em situação de campo realizado no período de sete semanas entre 11/04/2018 à 25/05/2018.....39
- Figura 9** – Média porcentual da mortalidade das réplicas dos tratamentos e controle no período em relação às semanas decorrentes (S) nos tratamentos: controle, Vectobac® WG e BioUEL-GD larvas de *Aedes* em situação de campo simulado no período de oito semanas entre 15/10/2019 à 06/12/2019.41
- Figura 10** – Média porcentual da taxa de diminuição populacional semanal das larvas de *Culex* expostas três tratamentos: controle Vectobac® WG e BioUEL-GD, e temperatura média semanal sob condições de campo no período de dez semanas entre 18/03/2019 à 23/05/2019. ...44
- Figura 11** – Média da flutuação populacional a cada 24 horas das dez semanas decorrentes do experimento quanto ao número de larvas coletadas dos tratamentos Controle, BioUEL-GD e Vectobac® WG com seus intervalos de confiança quanto a normalidade da variação populacional do período entre 18/03/2019 à 23/05/2019.46
- Figura 12** – Unidades formadoras de colônias de Bti em meio LB com 100µL/mL de ampicilina inoculadas com amostras da água dos recipientes do experimento em condições de campo para larvas de *Culex* coletadas na superfície e fundo ao fim da primeira semana de atividade dos formulados BioUEL-GD e VectoBac® WG. Amostras da superfície do (A) Controle, (B) BioUEL-GD e (C) Vectobac® WG. Amostras do fundo do recipiente (D) Controle, (E) BioUEL-GD e (F) Vectobac® WG.48
- Figura 13** – Meio LB com 100 µL/mL de ampicilina inoculadas com amostras da água dos recipientes do experimento em condições de campo para larvas de *Culex* coletadas na superfície e fundo ao fim da décima semana de atividade dos formulados BioUEL-GD e VectoBac® WG. Amostras da superfície do (A) Controle, (B) BioUEL-GD e (C) Vectobac® WG. Amostras do fundo do recipiente (D) Controle, (E) BioUEL-GD e (F) Vectobac® WG.49

Figura 14 – Número total de larvas da lagoa de tratamento de efluentes colonizada por larvas de *Culex* amostrada sob aplicação do formulado BioUEL-GD em relação à temperatura (°C) e precipitação (mm), com duas réplicas de 15 dias o período de 29/10/2019 à 27/11/2019.....50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentrações Letais à 50% e 90% formulados a base Bti (mg/L) e seus valores mínimos e máximos sobre *Aedes* de BioUEL-C, e determinação da toxicidade (UTI/mg) comparados com Vectobac® WG de cinco réplicas em condições de laboratório realizados entre 20/03/2017 a 31/03/2017.....37
- Tabela 2** – Médias percentuais de mortalidade e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos Denguetech® DT, VectoBac® WG e BioUEL-C para larvas de *Aedes* no período de sete semanas entre 11/04/2018 à 25/05/2018.....38
- Tabela 3** – Média dos parâmetros abióticos da água dos recipientes e valores mínimos e máximos utilizados para exposição das larvas de *Aedes* aos produtos Denguetech®, Vectobac® WG e BioUEL-C mantidos sob condições de campo durante o período de sete semanas 11/04/2018 à 25/05/2018.....39
- Tabela 4** – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos Denguetech®, Vectobac® WG e BioUEL-GD em situação de campo com larvas de *Aedes* no período de oito semanas entre 15/10/2019 à 06/12/2019.....41
- Tabela 5** – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos, Vectobac® WG e BioUEL-GD em situação de campo com larvas de *Culex* no período de dez semanas entre 18/03/2019 à 23/05/2019.....43
- Tabela 6** – Médias das amostras das réplicas do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) de Bti em experimento em situação de campo para larvas de *Culex* em caixas d'água na superfície (Sup.) e fundo (Fun.) dos tratamentos controle e formulados Vectobac® WG e BioUEL-GD ao decorrer das dez semanas (Sem.) no período de 18/03/2019 à 23/05/2019.....47
- Tabela 7** – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre as duas réplicas de aplicação do formulado BioUEL-GD em lagoa de tratamento de efluentes em campo com larvas de

Culex entre 29/10/2019 à 27/11/201951

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	<i>Aedes</i>
B.	<i>Bacillus</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>israelensis</i>
CL	Concentração letal
Cx.	<i>Culex</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
Fun.	Fundo
IB	Índice de Breteau
IIP	Índice de Infestação Predial
kdr	Knockdown resistance
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LIRAA	Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo <i>Aedes aegypti</i>
LTE	Lagoa de Tratamento de Efluentes
PEAA	Plano de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
PNCD	Plano Nacional de Combate à Dengue
Sem.	Semana
Sup.	Superfície
TDS	Sólidos Totais Dissolvidos
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CULICIDAE - MOSQUITOS	16
1.1.1	Biologia Geral e Classificação.....	16
1.1.2	Criadouros.....	17
1.1.3	Epidemiologia.....	18
1.2	MONITORAMENTO E CONTROLE DE <i>Aedes</i>	20
1.2.1	Políticas Públicas e Formas de Controle.....	20
1.2.2	O <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>israelensis</i> no Controle Biológico	22
1.2.3	Mecanismo de Ação	23
1.3	OBJETIVOS.....	24
1.3.1	Objetivo Geral	24
1.3.2	Objetivos Específicos	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	BIOINSETICIDA	25
2.1.1	Bactéria	25
2.1.2	Elaboração do Fermentado	25
2.1.3	Elaboração do Formulado	26
2.1.3.1	Comprimido larvicida	26
2.1.3.2	Grânulo dispersível em água.....	27
2.2	BIOENSAIOS	27
2.2.1	Criação de larvas	28
2.2.2	Formulados Modelos	29
2.2.3	Bioensaios Laboratoriais	29
2.2.4	Bioensaios em Condições de Campo	30
2.2.4.1	Análises microbiológicas	33
2.2.5	Campo.....	34
2.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1	BIOENSAIO LABORATORIAL	37
3.2	BIOENSAIOS EM CONDIÇÕES DE CAMPO	38

3.2.1	<i>Aedes</i>	38
3.2.2	<i>Culex</i>	42
3.2.2.1	Análise microbiológica.....	46
3.3	CAMPO	49
4	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 CULICIDAE - MOSQUITOS

1.1.1 Biologia Geral e Classificação

A classe Insecta, maior grupo do reino Animal apresenta mais de um milhão de espécies descritas, possuindo um grande sucesso evolutivo devido as suas adaptações fisiológicas e morfológicas oriundas das pressões ambientais ao longo de milhões de anos. Esse processo também reflete a ampla distribuição geográfica dos insetos (Brusca *et al.* 2018), além da sua importância na composição dos ecossistemas.

A família Culicidae (Diptera), conhecidos como mosquitos, pernilongos, sovelas, muriçocas, carapanãs e bicudas, estão presentes praticamente em todos os habitats, aquáticos e terrestres, com ampla distribuição entre as diferentes regiões geográficas do mundo, desde regiões subtropicais ao ártico (Rueda, 2008).

Precipitações e temperaturas elevadas, sobretudo dos climas tropicais e subtropicais, juntamente com alterações climáticas decorrentes do aquecimento global e ações antrópicas favorecem condições adequadas para o desenvolvimento, proliferação e sucesso adaptativo destes insetos (Forattini, 2002; Araújo *et al.* 2016; Marques, 2017). Os culicídeos também podem ser influenciados por fatores como luz, salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos (Consoli & Oliveira 1994).

O táxon compreende cerca de 3.500 espécies distribuídas em 41 gêneros diferentes, com 31% dessa diversidade ocorrendo em regiões Neotropicais (Harbach & Kitching, 1998; Guedes, 2012; Foster & Walker, 2019; WRBU, 2019).

Os mosquitos são de pequeno porte e possuem escamas por todas as veias das asas e uma franja de escamas localizada às bordas da mesma (Consoli & Oliveira 1994).

A classificação atual reconhece três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae, sendo Anophelinae considerado o grupo mais basal

(Harbach & Kitching, 1998). Alguns autores recentes, a partir de análises morfológicas e moleculares rebaixam Toxorhynchitinae à tribo de Culicinae (Foster & Walker, 2019).

1.1.2 Criadouros

Culicídeos possuem um ciclo de vida de aproximadamente 45 dias no qual apresenta estágios de ovo, quatro instares larvais, pupa, que se desenvolvem e dependem do ambiente aquático enquanto os adultos alados do ambiente terrestre (Forattini & Massad, 1998; Costa, 2001, Foster & Walker, 2019).

Os ovos são depositados nos mais variados corpos d'água, ou à borda dos mesmos, para seu desenvolvimento (Gomes *et al.*, 2006). Criadouros naturais como buracos em árvores, internódios de bambus, cascas de árvores, acúmulos de água nas axilas de bromélias ou frutos caídos utilizados por diversas espécies de mosquitos para sua reprodução (Lopes *et al.*, 1983; Consoli & Oliveira 1994; Forattini 2002; Zequi *et al.* 2005) e criadouros artificiais como garrafas e copos plásticos, pneus, tampas, galões, materiais de construção e até mesmo reservatórios subterrâneos de captura de água da chuva são amplamente utilizados por fêmeas de culicídeos mais adaptados ao ambiente antrópico em áreas urbanas (Cardoso *et al.*, 2015; Lima-Camara, 2016; Bermudi *et al.*, 2017; Beserra *et al.* 2017; Montagner *et al.* 2018). Desta forma, ocupam um considerável espectro de ambientes aquáticos e com ampla diversidade de ecossistema desde minas de diamantes na África a elevadas altitudes, ambiente marinho e os mais sinantrópicos em praticamente todo material que possa acumular água (Forattini, 2002; Rueda, 2008).

A maioria das larvas de mosquitos se alimentam de matéria orgânica particulada em suspensão ou de microrganismos presentes na água do criadouro (Harbach, 2007), sendo classificadas então como organismos coletores-filtradores. Em ambientes impactados, componentes desse grupo funcional se favorecem sobre outros organismos e destacam-se em abundância em função do maior aporte de matéria orgânica suspensa, como espécies dos gêneros *Aedes* Meigen, 1818 e *Culex* Linnaeus, 1758 facilitando assim a colonização de ambientes antrópicos e impactados (Silveira 2004; Chaves *et al.* 2011).

A maioria das fêmeas de Culicidae, das subfamílias Anophelinae e Culicinae, são hematófagas alimentando-se do sangue de diversos vertebrados.

Esse hábito alimentar torna essas fêmeas importantes vetores de patógenos que causam diversas doenças e levantam preocupação da sociedade e órgãos de saúde pública (Molyneux, 1997; Montagner *et al.* 2018).

Dentre as 466 espécies de culicídeos que ocorrem no Brasil, destacando-se as espécies dos gêneros *Anopheles* Meigen, 1818, *Aedes*, *Haemagogus* Linnaeus, 1758 e *Culex*, que estão envolvidas na transmissão de diferentes agentes etiológicos na área urbana e silvestre (Guedes, 2012; Medeiros-Souza *et al.* 2013). O sucesso adaptativo dos mosquitos às variáveis ambientais os leva a se proliferar por diferentes áreas e resultam numa ampla distribuição de patógenos que veiculam doenças pelo mundo (Rueda 2008; Vega-Rúa *et al.* 2014; Zara *et al.* 2016), causando milhares de mortes.

1.1.3 Epidemiologia

No Brasil o *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, 1762 é considerado o principal vetor de diversas arboviroses (Forattini 2002; Montagner *et al.* 2018). Entretanto, pela dinâmica de vetores, atualmente *Ae. aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse, 1894 veiculam juntos, na área urbana, uma série de vírus causadores de doenças como dengue, chikungunya, febre Zika e a febre amarela urbana, apresentando alta plasticidade genética tanto na veiculação dos patógenos como colonização de habitats (Martins *et al.* 2012; Zara *et al.* 2016).

A dengue é uma doença febril aguda, causada por um vírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*. São conhecidos atualmente quatro sorotipos com propriedades antigênicas diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Tauil, 2001).

Em 2019, foram notificados 1.544.987 casos prováveis (taxa de incidência de 735,2 casos por 100 mil habitantes) de dengue no país, sendo a região Centro-Oeste com 1.349,1 casos/100 mil hab. e a região Sudeste com 1.159,4 casos/100 mil habitantes com as maiores taxas. Em relação ao ano de 2018 houve um aumento de 480,97% de casos prováveis no país, com aumento na incidência inclusive em períodos no qual espera-se uma redução de casos como o inverno e 782 casos de óbitos confirmados (Brasil, 2019a; Brasil, 2020).

Outras importantes arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, como Chikungunya (CHIKV) e a febre Zika (ZIKV), apresentaram também um aumento em

número de casos em relação à 2018. Para chikungunya em 2019 foram notificados 132.205 casos prováveis no país com 92 óbitos confirmados em relação à 2018, onde foram registrados 87.687 casos prováveis. Os casos de febre Zika também aumentaram, onde foram registrados em 2019 10.768 casos prováveis, em relação 2018 com 8.680 casos prováveis foram registrados (Brasil, 2019a; Brasil, 2020).

Entre os anos de 2014 e 2015, o Brasil vivenciou um surto de casos de microcefalia, abortos espontâneos e uma série de complicações neurológicas em neonatais associadas à infecção pelo vírus Zika tornando-se um fato de emergência em saúde pública de interesse internacional (Albuquerque *et al.* 2018).

Problema que se intensificou no primeiro semestre de 2015, sobretudo no estado de Pernambuco, foi a síndrome Guillain-Barré (SGB). A SGB é uma polirradiculoneuropatia inflamatória de caráter autoimune de rápida evolução, em casos mais graves pode chegar em até quatro semanas o desenvolvimento de insuficiência respiratória podendo ocorrer graves sequelas e óbitos em até 20% e 5% dos casos, respectivamente (Cabral *et al.* 2012; Nobrega *et al.* 2018). Estudos como Malta *et al.* 2016 e Nobrega *et al.* 2018 mostram que seu surto de casos e manifestações neurológicas possuem possível relação a infecções por dengue, chikungunya e sobretudo do vírus Zika.

Outro problema que voltou ao centro da discussão foi a febre amarela silvestre. Ao final de 2016, o país registrou um de seus maiores surtos de transmissão, e considerando que as áreas mais atingidas são próximas a grandes centros urbanos populosos e com infestação de *Ae. aegypti*, isso reacendeu a preocupação das autoridades em relação à área de circulação viral (Cavalcanti & Tauil, 2017).

Outro gênero comum de culicídeos é *Culex*, importante transmissor do vetor etiológico da filariose no Brasil, hoje restrito ao nordeste do país, e potencial vetor do vírus da febre do Nilo Ocidental. Alguns trabalhos recentes como Boccolini *et al.* 2016 e Guedes *et al.* 2017 mostram certa relação entre mosquitos deste gênero para a transmissão do vírus ZIKV experimentalmente, aumentando o espectro de vetores. Trabalhos de Liu *et al.* 2017 e Fernandes *et al.* 2017 excluem esta relação, sendo assim uma situação ainda não totalmente elucidada.

Larvas de mosquitos desse gênero colonizam facilmente lagoas de tratamento de efluentes, pela grande quantidade de matéria orgânica, que suportam alta densidade populacional de larvas (Zequi *et al.*, 2014).

1.2 MONITORAMENTO E CONTROLE DE *Aedes*

1.2.1 Políticas Públicas e Formas de Controle

O controle das doenças está diretamente relacionado com o controle da população dos vetores. Sendo o *Ae. aegypti* o principal vetor de arboviroses no Brasil, medidas para monitoramento e controle desse vetor foram tomadas pelo poder público, com um foco especial nessa espécie.

A partir de 1996 iniciou-se as ações integradas a partir do aumento da incidência de dengue e ampla distribuição do *Ae. aegypti*. O Ministério da Saúde implementou o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) com atuação de múltiplos setores articulados de forma descentralizada (Braga & Valle, 2007; Brasil, 2009). Em 2001, mudou-se o foco do combate generalizado ao vetor e focou-se em municípios com maior incidência das doenças, e em função do aumento dos riscos de epidemias, casos graves e reintrodução de novos sorotipos foi elaborado o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (Braga & Valle, 2007; Brasil, 2009; Figueiró *et al.* 2010; Zara *et al.* 2016).

O PNCD envolve dez principais componentes: vigilância epidemiológica, combate ao vetor, assistência aos pacientes, integração com atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação, sustentação político-social e acompanhamento e avaliação do PNCD (Brasil, 2002; Braga & Valle, 2007; Figueiró *et al.* 2010; Zara *et al.* 2016).

Dessa forma, com a implementação dos planos, as ações de combate ao vetor ocorrem pela vigilância epidemiológica, a fim de medir a densidade dos mosquitos nas áreas urbanas. A principal ferramenta do poder público de monitoramento é o Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) onde a avaliação e mapeamento dos níveis de infestação resultantes a partir de cálculos do Índice de Infestação Predial (IIP), que faz relação expressa em porcentagem entre o número de imóveis positivos e o número de imóveis pesquisados, do Índice de Breteau (IB) que faz uma avaliação da densidade larvária de *Ae. aegypti* em relação aos imóveis existentes na área urbana infestadas e tipo de recipiente em relação à positividade de larvas, ao qual já promove um

controle mecânico a partir da eliminação do criadouro (Brasil, 2001; Brasil, 2005; Braga & Valle, 2007).

Como controle, os inseticidas sintéticos seguem sendo a principal fonte de controle das larvas e adultos de mosquitos no Brasil, seja pelas ações dos órgãos governamentais quanto da sociedade, pelo seu baixo custo e fácil manejo. Utiliza-se principalmente organofosforados, carbamatos e piretróides, os quais podem causar danos à saúde humana e ambiental pela alta toxicidade, efeito residual e pouca especificidade. A dispersão aeroespacial de inseticidas por exemplo, utilizada para o controle de surtos e epidemias, não é seletiva aos mosquitos alvo (WHO, 1996; Brasil, 2009).

O uso contínuo destas substâncias aumenta a seleção de insetos resistentes, processo que inviabiliza a aplicação destes componentes o (Alves, 1998; Forattini, 2002; Arantes *et al.*, 2002). O surgimento de alelos *kdr* que permitem a resistência a inseticidas sintéticos piretróides em populações naturais já foi constatada, esse alelo que garante resistência a diversos inseticidas sintéticos comerciais atuando na regulação dos canais de sódio regulado por voltagem (Brito *et al.*, 2013; Linss *et al.*, 2014; Cruz, 2017; Lopes, 2019).

No Brasil, por muito tempo as diretrizes de utilização de inseticidas emanado do governo federal apontou principalmente por inseticidas sintéticos do grupo dos organofosforados, sendo que o larvicida mais utilizado foi o Temefós até os anos 2000 pela seleção da resistência substituído pelo regulador de crescimento Methoprene e adulticidas piretróides substituído pelo organofosforado Malathion em 2009, este, aplicado por nebulização, popularmente chamado de fumacê, sendo um recurso extremo indicado somente para casos de alta transmissão em surtos ou epidemias (Braga & Valle 2007; Monnerat *et al.* 2012; Santos, 2016).

Devido a seleção de mosquitos resistentes por Malathion, produto amplamente utilizado no controle de adultos o governo emitiu a Nota Informativa N° 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS com recomendações para manejo da resistência de *Ae. aegypti* a inseticidas utilizando-se novos produtos químicos que não são seletivos. As novas propostas para controle larval prevêm a utilização do larvicida biológico com ação de toxina de *Saccharopolyspora spinosa* nas formulações granulada (G); pastilha (DT) e tablete (XRT); para controle adulto o adulticida residual com a combinação das moléculas Clotianidina e Deltametrina em formulação de pó molhável e; adulticida espacial a combinação das moléculas

Praletrina e Imidacloprida em ultra baixo volume (Brasil, 2019b).

Em decorrência dos efeitos adversos determinado pelos inseticidas na saúde humana e ambiente associado a não seletividade métodos clássicos de controle e novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para suprir a necessidade de reverter tais situações e fazer um controle efetivo.

Novas tecnologias sendo aprimoradas e desenvolvidas com grande potencial e resultados significativos; porém longe de aplicações em campo com alta efetividade no controle (Ramirez *et al.* 2009; Reis-Castro & Hendrickx, 2013). Moléculas sintéticas análogas aos hormônios de crescimento ou químicos que retardam o desenvolvimento dos insetos, agindo como reguladores de crescimento os quais apresentam uma alta especificidade e baixa toxicidade contra insetos não-alvo (Resende & Gama, 2006; Bouaziz *et al.* 2017); Mosquitos transgênicos irradiados a fim modificar os processos reprodutivos a partir da exposição de machos à radiação gama, tornando-os estéreis, e ao cruzar com mosquitos selvagens gerando prole inviável, suscitando um aumento momentâneo seguido pelo decréscimo populacional (Benedict & Robinson, 2003; Bernate & Meyer, 2017; Machi, 2019); Populações infectadas por bactérias endossimbióticas do gênero *Wolbachia* que garante uma potencial bloqueio da capacidade de transmissão de patógenos (Dutra *et al.* 2016; Jiggins, 2017).

1.2.2 O *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* no Controle Biológico

O controle biológico de mosquitos por bactérias é um método tradicional não amplamente empregado, no Brasil apesar de ser uma forma seletiva e eficiente para controle dos mosquitos (Marcoris *et al.*, 2003). Esses entomopatógenos acarretam vantagens sobre os inseticidas tradicionais em consequência da elevada especificidade, redução de contaminação ambiental e não apresentam riscos à saúde humana, e são importantes fontes para controle específico de insetos vetores de patógenos (Angelo *et al.*, 2010; Bravo, 2018).

B. thuringiensis Berliner, 1915 é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos, descoberta no Japão em virtude da morte de larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758) (Brar *et al.*, 2006). Esse microrganismo possui propriedades tóxicas que durante sua fase de esporulação formam inclusões cristalinas (Cry e Cyt), e durante sua fase vegetativa de crescimento sintetiza as

toxinas Vip, outro grupo de proteínas de ação entomopatogênica (Schnepf et al., 1998; Vilas-Bôas et al. 2007; Araújo et al., 2007; Ootani et al., 2011; Bravo, 2018).

Essas proteínas são liberadas pela lise celular no processo de liberação do esporo que possuem propriedades entomopatogênicas especialmente para insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (Schnepf et al. 1998; Vilas-Bôas, 2007; Bravo et al. 2007).

O *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* Glatron & Rapoport, 1977, possui uma significativa especificidade a larvas de dípteros, sobretudo das famílias Culicidae e Simuliidae. Pelo complexo mecanismo de ação, envolvendo diversas proteínas, diferentemente dos inseticidas sintéticos, o potencial de desenvolvimento de resistência às suas toxinas é reduzido (Lacey, 2007; Boyce et al., 2013) e até hoje quase não há tem registro de resistentes em campo (Bravo et al. 2011).

As inclusões proteicas sintetizadas pelo Bti são compostas por proteínas Cry e Cyt, possuem atividade contra mosquitos: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2BA, as quais possuem a capacidade de agir sinergicamente (Schnepf et al. 1998, Van Frankenhuyzen, 2009).

1.2.3 Mecanismo de Ação

Os mecanismos de ação das proteínas Cry envolvem primariamente a solubilização do cristal no trato do intestino médio a partir do pH alcalino, liberando os monômeros proteicos na forma de protoxinas a partir das quebras das ligações de sulfeto. As protoxinas são ativadas proteoliticamente na mucosa do intestino médio das larvas dos mosquitos (Schnepf, et al., 1998; Bravo et al., 2007; Torres-Quintero et al., 2018).

As toxinas ativas ligam-se a receptores específicos na borda apical do epitélio dos insetos suscetíveis causando inserção da toxina na membrana, criando canais de atividade iônica ou poros transmembrana que causam a lise celular, a quebra do equilíbrio osmótico, liberação dos componentes intracelulares seguidos da morte do inseto (Schnepf, et al., 1998; Bravo et al., 2007).

As proteínas Cry são compostas por três domínios: o primeiro corresponde a uma estrutura α -hélice responsável pela formação do poro, o segundo e o terceiro domínio correspondem a estruturas folhas- β , sendo o segundo domínio

responsável pela seletividade da proteína, e o terceiro apresenta funcionalidades acessórias à formação dos poros e também quanto à seletividade (Schwartz *et al.* 1997; Maagd *et al.* 2001)

As proteínas Cyt também são solubilizadas e ativadas no aparelho digestivo do inseto. Essas toxinas são compostas de um único domínio formador de poros, mas não se ligam em receptores específicos de membrana. Essas proteínas possuem uma alta afinidade com os ácidos graxos insaturados que compõem o intestino médio das larvas, aos quais se ligam formando poros, diretamente a partir da ligação com a bicamada lipídica (Bravo *et al.*, 2007; Ben-Dov, 2014).

A ação de ambas as proteínas Cry e Cyt paralisa o trato digestório, o que causa inanição, paralisa os músculos e acomete infecção generalizada levando os insetos à morte (Bravo *et al.*, 2007; Bravo & Soberón, 2008).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de um novo isolado e formulado à base de *B. thuringiensis israelensis* (Bti) para o controle biológico de *Aedes* e *Culex* em condições de laboratório e em campo.

1.3.2 Objetivos Específicos

Desenvolvimento de novos formulados a partir de Bti para controle de *Aedes* e *Culex* de acordo com as condicionantes de criadouro;

Obter a concentração letal (CL) à 50% de mortalidade (CL₅₀) e à 90% (CL₉₀) em condições de laboratório com *Aedes*;

Calcular a potência do novo formulado contendo Bti, em UTI/mg;

Verificar eficácia e atividade residual do novo formulado sobre *Aedes* e *Culex* em condições de campo;

Relacionar os fatores abióticos e persistência do Bti em condições de campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BIOINSETICIDA

2.1.1 Bactéria

A linhagem do *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* cepa BR14 foi isolada no estado do Espírito Santo, Brasil e doada pela Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária - EMCAPA a Universidade Estadual de Londrina – UEL. A cepa foi sorotipada como pertencente a subespécie *israelensis* pelo Instituto Pasteur, na França, e é mantida na forma esporulada no banco de linhagens de *B. thuringiensis* do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias.

2.1.2 Elaboração do Fermentado

O *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti) foi recuperado por hidratação e inoculado em meio sólido Luria-Bertani (LB).

Para manter em meio líquido, foi preparado um pré-inóculo em meio de cultura conhecido como NYSM (Myers & Yousten, 1980). Em Erlenmeyer com capacidade de 1 L foram distribuídos 200 mL de meio e inoculado por meio de alça de transferência do Bti recuperado, mantendo-se em estufa para crescimento à 30°C por 48h. Após o crescimento as amostras foram aliqüotadas em microtubos de 2 mL e armazenadas à 2° C ± 2 para uso futuro como fonte da bactéria.

A partir desta fonte de bactéria armazenada, foi preparado o inóculo do fermentado. Em dois frascos de rosca com volume de 100 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido LB, foi inoculado 2% de seu volume (600 µL) do pré-inóculo fonte previamente preparado. Os frascos foram mantidos em agitação à 30°C por 6 horas à 120 rotações por minuto.

Após o crescimento, os inóculos foram adicionados ao biorreator (Allbiom - AllMic LAB SCR07 - twin) suprido com 6 litros de meio NYSM e mantido à 30° C ± 2, 300 RPM, pH 7,0 e com fornecimento de ar constante de 1 L/min para cada litro de meio até completa esporulação, por cerca de 40 horas.

O fermentado foi centrifugado à 13,700 x g RCF, entre 12 e 15° C,

por 15 minutos (Sorvall - RC-5C), descartando o sobrenadante. O conteúdo sólido foi congelado à -20°C, e submetido a liofilização (Liotop - L101) por 24h.

2.1.3 Elaboração do Formulado

2.1.3.1 Comprimido larvicida

Os comprimidos larvicidas contendo Bti liofilizado em associação com substâncias excipientes (Methocel®, Amido, Microcel® e Estearato de Magnésio) foram confeccionados via compressão direta em máquina adaptada (ERWEKA EK0) com massa de 50 mg no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (Figura 1).

Esta formulação, chamada BioUEL-C, foi desenvolvida contendo duas partes; uma de liberação instantânea das proteínas e a outra de liberação lenta em ambientes de menor quantidade de água, como caixas d'água, ambientes estes com frequente presença de mosquitos *Aedes*.

Figura 1 – Formulado em comprimido BioUEL-C à base de Bti cepa BR14 de massa de 50 mg desenvolvido para recipientes de pequeno porte para o controle larval de *Aedes* com capacidade de liberação instantânea e parte de liberação lenta das proteínas.



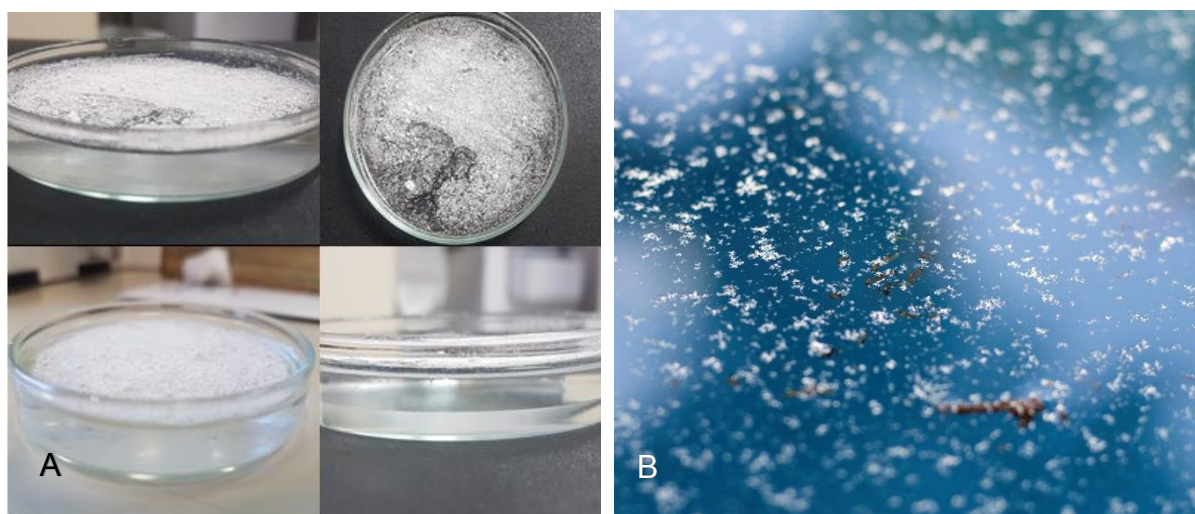
Fonte: Acervo do Laboratório de Entomologia Geral e Médica - UEL

2.1.3.2 Grânulo dispersível em água

Foi produzido também um formulado na forma de grânulo dispersível com capacidade de permanecer em suspensão sobre a água, chamado de BioUEL-GD (Figura 2). Na preparação pesou-se o Bti fermentado liofilizado e o excipiente de interesse, misturando-os em almofariz de porcelana, e foi adicionado água destilada.

Após essa etapa, essa massa foi passada em peneira granulométrica 24 mesh, colocada em estufa à 35° C por 30 minutos. Após o tempo de espera, a mistura foi passada em peneira granulométrica de 60 mesh, obtendo assim, o grânulo dispersível em água.

Figura 2 – Grânulos dispersíveis em água larvicida formulado à base de Bti com característica de suspensão na água. (A) em placas de Petri em situação de laboratório e (B) em caixas d'água experimentalmente.



Fonte: O próprio autor/Laboratório Tecnologia Farmacêutica, UFPR

2.2 BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados segundo o protocolo proposto pela *World Health Organization - WHO* (2005) para estudos dos impactos de larvicidas bacteriológicos, no qual segue-se três fases: 1) Estudos laboratoriais; 2) Ensaio de campo em pequena escala e; 3) Ensaio de campo em grande escala.

O uso deste protocolo é importante a fim de haver uma harmonização e padronização nos procedimentos de testes em todo mundo e ser

mais objetivo quanto a regulamentação e registro de forma uniforme e segura.

2.2.1 Criação de Larvas

O suprimento de larvas de *Aedes* para os bioensaios, foram obtidos a partir de ovos coletados em campo com a utilização de armadilhas de oviposição, conhecidas como ovitrampas. Essas foram dispostas por diversos centros de estudos distribuídos no campus da Universidade Estadual de Londrina em um período contínuo a partir de agosto de 2018 até o fim dos experimentos.

A armadilha de oviposição utilizada foi à proposta por Fay & Eliason 1966, a qual é composta por um vaso plástico preto com 500 mL de capacidade, com 300 mL de mistura atrativa para as fêmeas de *Aedes* e palhetas de madeira duratree de 15x3x0,5 cm com uma face áspera para a oviposição (Figura 2). O fluido atrativo é composto por 300 mL de uma solução de levedo de cerveja à 0,4 g/L de água (Depoli *et al.* 2016; Silva *et al.* 2017).

A cada quatro dias as ovitrampas foram retiradas e substituídas a fim dos ovos não eclodirem.

Figura 3 – Armadilha ovitrampa para a captura de ovos de *Aedes* em campo dispostas no campus da Universidade Estadual de Londrina durante todo o período de experimentação.



Fonte: Acervo do Lab. de Entomologia Geral e Médica - UEL

Em bandejas plásticas com água destilada obtida por osmose reversa, as palhetas com ovos foram submersas para sua eclosão. Foram mantidas em incubadora BOD à 25° C ± 2° C, umidade de 80 ± 5% controlados a partir de um termo-higrômetro digital (Center 342), e fotoperíodo de 14 horas de luz para 10

horas escuro (Silva *et al.*, 1998; Zequi *et al.*, 2011). Estas larvas, quando em 3º instar ou 4º instar inicial foram separadas para a realização de bioensaios.

2.2.2 Formulados Modelos

Neste trabalho para parâmetros comparativos com os novos formulados foram utilizados dois produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* como modelo, sendo um deles de origem importada e outro nacional.

VectoBac® WG é um larvicida biológico na formulação de grânulos dispersíveis em água produzido pela empresa estadunidense *Valent BioSciences Corp.* O produto é recomendado para o controle principalmente de mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*, sobretudo *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Considerado eficaz e estável no armazenamento, esta formulação é produzida à base de Bti da cepa AM 65-52 toxicidade conhecida de 3.000 UTI/mg. Recomenda-se a aplicação de 0,2 a 0,4 g/100 L de água. Para os experimentos foram utilizados os lotes: 267-853-PG e 291-325-PG30.

DengueTech® DT é um larvicida biológico formulado pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) em forma de comprimidos. O produto é recomendado para o controle principalmente de mosquitos do gênero *Aedes*, sobretudo *Ae. aegypti*. A formulação possui toxicidade conhecida de 2.000 UTI/mg, e recomenda-se utilização de um comprimido para até 50 L, propondo uma eficácia de até 60 dias. O lote utilizado nos experimentos foi o 0101.

2.2.3 Bioensaios Laboratoriais

Os bioensaios em pequena escala, em fase laboratorial, tiveram o objetivo de calcular a toxicidade em UTI/mg de um novo produto e as concentrações letais à 50% (CL₅₀) de mortalidade e à 90% (CL₉₀) de mortalidade em relação à um produto comercial padrão. Os ensaios ocorreram entre 20/03/2017 a 31/03/2017 no Laboratório de Entomologia Geral e Médica da Universidade Estadual de Londrina.

Em copos plásticos com capacidade de 300 mL com 150 mL de água destilada foram acondicionadas 25 larvas de *Aedes* em terceiro instar, ou quarto instar inicial. O produto Vectobac® WG foi utilizado como referência.

Foram testados para as formulações BioUEL-C o produto padrão Vectobac® WG (267-853-PG) nas concentrações para cada copo de: 0,04mg/L, 0,03mg/L, 0,02mg/L, 0,01mg/L, 0,008mg/L e 0,005mg/L, e controle contendo somente água e larvas para cada tratamento (Zequi *et al.* 2017).

Foram realizadas cinco repetições em dias distintos em condições controladas, à 25° C ± 2° C, umidade de 80 ± 5% e fotoperíodo 14 horas/luz (Figura 4).

A mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo de agitação da água ou não emergiam à superfície.

Figura 4 – Bioensaio laboratorial para determinação da toxicidade (UTI/mg) do formulado BioUEL-C com larvas de 3º instar de *Aedes*, cinco repetições em dias distintos mantidos em BOD com condições controladas de 25° C ± 2° C, umidade de 80 ± 5% e fotoperíodo 14 horas/luz.



Fonte: O próprio autor.

2.2.4 Bioensaio em Condições de Campo

Os bioensaios em condições de campo, foram realizados no campus da Universidade Estadual de Londrina – UEL, em uma área recoberta por

vegetação, com presença de árvores de médio à grande porte chegando à cerca de 15 metros de altura e com sombreamento parcial durante o dia.

Na primeira etapa, para mosquitos do gênero *Aedes* os testes com a formulação BioUEL-C ocorreram no período de 11/04/2018 à 25/05/2018.

Em campo, foram instalados baldes plásticos brancos com 10 litros de água da rede de abastecimento. Em cada recipiente foram adicionadas 20 larvas de terceiro ínstar, ou quarto ínstar inicial oriundas a partir da coleta de ovos do campo por armadilhas e oviposição. Foram testados quatro tratamentos com cinco réplicas cada: BioUEL-C, VectoBac® WG (267-853-PG), DengueTech® DT (0101) e controle. As réplicas dos diferentes tratamentos foram distribuídas aleatoriamente na área (Figura 5).

A concentração aplicada se deu unicamente no primeiro dia do experimento seguindo recomendação do fabricante, sendo: um comprimido de 50 mg do formulado BioUEL-C, 0,003 g/L do VectoBac® WG, um comprimido do DengueTech® DT. Nos controles não houve quaisquer aplicações além da presença das larvas.

Foi analisada a mortalidade após 24, 48 e 72 horas. Semanalmente um novo lote de larvas foi inserido a fim de visualizar a persistência da atividade biológica dos produtos testados.

Em um segundo momento, seguindo a mesma metodologia foi testada a atividade tóxica e persistência da formulação BioUEL-GD no período de 15/10/2019 à 06/12/2019 na mesma área. Os cinco testes foram realizados com BioUEL-GD com concentração de 0,002 g/L em relação a 0,003 g/L do VectoBac® WG (291-325-PG30) e controle.

As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo de agitação da água ou não emergiam à superfície.

Figura 5 – Segunda etapa de bioensaio em campo para larvas de *Aedes* com os tratamentos: Controle, Vectobac® WG, e BioUEL-GD com cinco repetições por tratamento realizado entre 15/10/2019 à 06/12/2019 na Universidade Estadual de Londrina.



Fonte: o próprio autor.

Os ensaios em campo para larvas de mosquitos *Culex* ocorreram no período de 18/03/2019 à 23/05/2019.

Foram dispostas nove caixas d'água abastecidas com 500 L de água da rede de abastecimento. Três réplicas para o controle, três com 0,003 g/L do Vectobac® WG (291-325-PG30) e três com 0,002 g/L para o formulado BioUEL-GD aplicados no primeiro dia de experimento (Figura 6A).

As larvas de *Culex* foram coletadas com rede para insetos aquáticos malha de 1,5 mm em estação de tratamento de esgoto (ETE) e lagoa de tratamento de efluentes (LTE) da região de Londrina. O lote de larvas coletadas com número indeterminado foi distribuído entre as caixas de forma equitativa. Colocadas em um balde com 10 L de água e distribuído um volume igual entre as caixas. Um novo lote de larvas foi adicionado semanalmente às caixas.

A mortalidade foi analisada em relação à diminuição populacional de larvas nas caixas d'água em relação à população inicial da referida semana, coletada às 0h e expressada em porcentagem, sendo o aumento da amostragem populacional expressada negativamente. Após 24, 48 e 72 horas os resultados obtidos foram comparados em relação à inicial, representando assim a diminuição populacional.

As larvas foram coletadas com o auxílio de rede para insetos aquáticos de malha 1,5 mm (Figura 6B), armazenadas em álcool 70% e contabilizadas. As pupas coletadas foram da relação do cálculo da diminuição populacional.

Em todos os experimentos foram monitorados diariamente o pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos (TDS), salinidade e temperatura da água com o auxílio de multiparâmetro (Hanna – HI9828). Foram feitas também medidas de temperatura atmosférica e umidade relativa do ar com o auxílio de termohigrômetro digital e luminosidade com luxímetro digital (Minipa – MLM-1010) em três horários (08:00, 12:00 e 18:00) em três pontos aleatórios dentro da área do experimento em todos os dias de coleta.

Figura 6 – Experimento em campo com larvas de *Culex* realizado no período de período de 18/03/2019 à 23/05/2019. (A) parte das caixas d'água do experimento dispostas em uma área do campus da Universidade Estadual de Londrina; (B) coleta das larvas para análise da mortalidade com o auxílio de rede.



Fonte: O próprio autor.

2.2.4.1 Análises microbiológicas

No ensaio para larvas de mosquitos do gênero *Culex* foi feita análise microbiológica para aferir a permanência do Bti nos recipientes aplicados. Ao final de cada semana, com o auxílio de seringa esterilizada foi coletado 20 mL de água da superfície e 20 mL do fundo de cada caixa d'água. Cada amostra foi misturada com 20 mL de glicerol à 50% e armazenada em freezer -20 °C.

Um total de 20 mL de cada amostra da solução foi centrifugada,

descartando o sobrenadante, e o corpo de fundo ressuspendido em 300 μ L de salina 0,8%.

Cada 100 μ L da solução foi semeado em placa de Petri com meio LB com 100 μ g/mL de ampicilina em triplicata. As placas foram incubadas em estufa à 30° C por 48 horas e unidades formadoras de colônias (UFC) de Bti foram contabilizadas (Zequi *et al.* 2015).

2.2.5 Campo

Uma lagoa de tratamento de efluentes de uma empresa de óleo de soja bruto da região de Londrina colonizada por *Culex* sp. foi selecionada para os testes. A lagoa possui uma área de 665 m² e recebe rejeitos da produção e das vias terrestres da empresa (Figura 7A).

A aplicação de 50 g da formulação BioUEL-GD se deu com dispositivo desenvolvido a partir de um tubo Falcon de 50 mL perfurado, preso em um cabo e pulverizado em toda a margem da lagoa de forma equitativa, em até um metro da borda, área onde as larvas de *Culex* usualmente colonizam e se alimentam (Figura 7B).

Foram definidos seis pontos de amostragem distribuídos em toda a volta da lagoa. Os parâmetros abióticos foram medidos em todos os dias de amostragem, e um termo-higrômetro foi mantido ao lado da lagoa para a medidas da temperatura atmosférica e umidade relativa. Multiparâmetros (Hanna – HI9828) foi utilizado para verificar o pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos, salinidade e temperatura da água nos pontos 1, 3 e 5 (Figura 7C).

A avaliação da flutuação populacional foi realizada ao início do experimento em zero horas, em 1 dia, 2, 3, 5, 7 e 15 dias. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma rede para insetos aquáticos de malha 1,5 mm, com um arrasto por ponto, de um metro adentro da lagoa até a borda pela superfície (Figura 7D). As larvas coletadas foram acondicionadas em frascos com álcool 90% identificados e armazenados a temperatura ambiente no Laboratório de Entomologia Médica segundo Zequi & Lopes, 2007.

Para testagem em campo foram realizadas duas repetições que ocorreu no período de 29/10/2019 à 13/11/2019 e 13/11/2019 à 27/11/2019.

Figura 7 – Experimento em campo para larvas de *Culex* em lagoa de tratamento de efluentes de empresa de óleo de soja em Cambé-PR no período de 19/10/2019 à 27/10/2019. (A) Área da lagoa de tratamento de efluentes como área de teste. (B) Dispositivo e aplicação do formulado BioUEL-GD. (C) Avaliação de parâmetros abióticos da água com auxílio de multiparâmetros. (D) Coleta de larvas com auxílio de rede.



Fonte: O próprio autor.

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises para determinação das concentrações letais e da toxicidade em UTI/mg seguem o protocolo de WHO (2005), ao qual foi seguido utilizado análise *Probit* das concentrações-respostas, determinando as concentrações letais à 50% (CL_{50}) e à 90% (CL_{90}) e intervalos de confiança. Para a determinação da toxicidade em UTI/mg utilizou-se a fórmula:

$$UTI/mg : \frac{[UTI/mg \text{ do padrão} \times CL_{50}(mg/L \text{ do padrão})]}{CL_{50} (mg/L \text{ do produto testado})}$$

Para os ensaios em situação simulada de campo e campo os dados das réplicas foram agrupados por média.

Teste t de Student a nível significativo de 5% foi utilizado entre dois tratamentos e quando três ou mais, Kruskal-Wallis a nível 5% de significância. As médias das variáveis abióticas dos tratamentos foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de significância ou Kruskal-Wallis a nível 5% de significância quando existiam mais que duas.

O software utilizado foi o IBM SPSS Statistics v. 25.0 (IBM Corp, 2019) e R v.3.6.2 (R Core Team, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 BIOENSAIO LABORATORIAL

A avaliação da mortalidade de larvas de *Aedes* ocorreu 48 horas após a aplicação do espectro de concentrações testadas do BioUEL-C em relação ao produto padrão VectoBac® WG.

O produto padrão possui uma toxicidade conhecida de 3.000 UTI/mg. A partir da aplicação de *Probit* com os dados de mortalidade coletados no bioensaio foi determinado a CL₅₀ e CL₉₀ e, seguindo o cálculo proposto no protocolo de WHO (2005) foi determinado que a formulação na versão comprimido, BioUEL-C, obteve toxicidade determinada de 2.700 UTI/mg (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações Letais à 50% e 90% formulados a base Bti (mg/L) e seus valores mínimos e máximos sobre *Aedes* de BioUEL-C, e determinação da toxicidade (UTI/mg) comparados com Vectobac® WG de cinco réplicas em condições de laboratório realizados entre 20/03/2017 a 31/03/2017.

Concentração Letal	Vectobac® WG	BioUEL-C
CL ₅₀	0,018 mg/L a (0,015 – 0,021)	0,02 mg/L a (0,017-0,024)
CL ₉₀	0,036 mg/L a (0,03 – 0,050)	0,041 mg/L a (0,033 – 0,055)
UTI/mg	3.000	2.700

*As médias seguidas das mesmas letras (agrupamentos) não possuem diferença estatística de acordo com teste de Kruskal-Wallis

Entre as concentrações letais entre BioUEL-C e VectoBac® WG, aplicando o teste de Kruskal-Wallis à nível de 5% de significância entre os tratamentos, a comparação das médias não houve diferença significativa, o que significa toxicidade equivalente entre o formulado testado e o padrão.

3.2 BIOENSAIOS EM CONDIÇÕES DE CAMPO

3.2.1 *Aedes*

Na primeira etapa, o experimento durou sete semanas, no sentido de avaliar a permanência e eficiência do formulado BioUEL-C em relação ao Denguetch® DT e Vectobac® WG para larvas de *Aedes*, além do tratamento controle. A média da mortalidade das sete semanas pode ser observada na Tabela 2.

Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis entre os quatro tratamentos, não houve diferença estatística entre as médias dos tratamentos com formulações comerciais à base de Bti ($p = 0,34972$), mantendo-se no agrupamento, diferente apenas em relação ao tratamento controle ($p = 0.01166$), onde não houve aplicação do larvicida.

Em situação de campo, não o suficiente para uma diferença significativa ($p = 0,20842$). No tratamento controle foi observada reduzida mortalidade (4,3%), o que evidencia a não contaminação por Bti, diferenciando-se estatisticamente dos tratamentos com formulados à base de Bti ($p = 0,00034$).

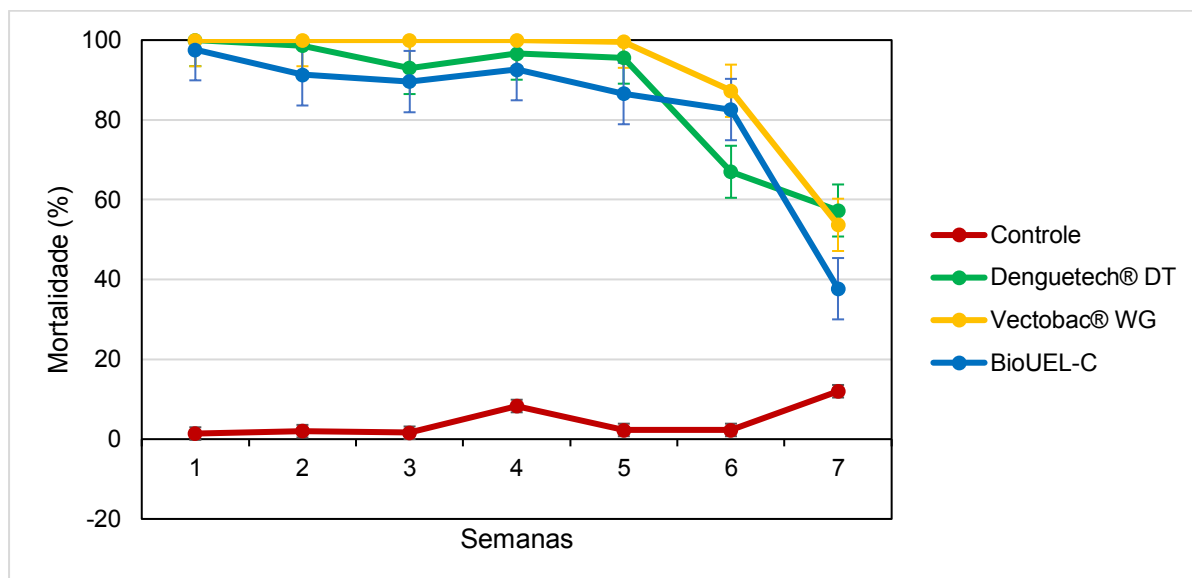
Tabela 2 – Médias percentuais de mortalidade e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos Denguetech® DT, VectoBac® WG e BioUEL-C para larvas de *Aedes* no período de sete semanas entre 11/04/2018 à 25/05/2018.

	Controle	Denguetech®	VectoBac® WG	BioUEL-C
Taxa de mortalidade média (%)	4,3 b (1,4 – 12)	86,9 a (57,3 – 100)	91,5 a (53,7 – 100)	82,6 a (37,7 – 97,6)

*As médias seguidas das mesmas letras (agrupamentos) não possuem diferença estatística de acordo com Kruskal-Wallis

Com o novo formulado proposto observa-se uma mortalidade uniforme em relação a formulados comerciais testados e bem estabelecidos no mercado, sendo que até a semana cinco do experimento as mortalidades foram equivalentes, iniciando uma queda de eficácia a partir da sexta semana de experimento (Figura 8).

Figura 8 – Média percentual da mortalidade das repetições dos tratamentos em relação às semanas decorrentes nos tratamentos: controle, Denguetech® DT, Vectobac® WG e BioUEL-C larvas de *Aedes* em situação de campo realizado no período de sete semanas entre 11/04/2018 à 25/05/2018.



O formulado BioUEL-C se mostra eficiente no controle de *Aedes* com um intervalo na taxa de mortalidade de 37,7% - 97,4% durante o período de exposição, sendo que a mortalidade foi superior à 90% durante as cinco primeiras semanas do experimento.

Os ensaios durante as sete semanas de persistência dos produtos ocorreram com temperatura ambiente média de 23,94°C, onde foram registradas variação entre mínima de 9,7 ° C e máxima de 37,8° C no período; umidade relativa de 51,52% e luminosidade médio de 11800 lúmens. Quanto às condições da água ao longo do experimento o pH médio foi de 7,70, temperatura média da água de 20,13° C, a condutividade média foi de 82,3 $\mu\text{S cm}^{-1}$, o TDS foi de 41,3 mg/L nos tratamentos com formulados (Tabela 3).

Tabela 3 – Média dos parâmetros abióticos da água dos recipientes e valores mínimos e máximos utilizados para exposição das larvas de *Aedes* aos produtos Denguetech®, Vectobac® WG e BioUEL-C mantidos sob condições de campo durante o período de sete semanas 11/04/2018 à 25/05/2018.

	Controle	Denguetech® DT	Vectobac® WG	BioUEL comp.
pH	7,64 a (7,25 – 7,81)	7,74 a (7,41 – 8,11)	7,74 a (7,37 – 8,11)	7,62 a (7,31 – 7,92)

Temperatura da água (°C)	20,46 a (15,36 – 25,29)	20,18 a (14,72 – 25,69)	20,16 a (14,69 – 25,51)	20,19 a (14,03 – 24,96)
Condutividade (µS cm ⁻¹)	87 a (70-109)	85 a (48 – 103)	84 a (70 – 100)	83 a (69 – 98)
TDS (mg/L)	53 a (35 – 55)	42 a (35 – 51)	42 a (35 – 50)	43 a (35 – 64)
Temperatura atmosférica (°C)		23,94 (9,7 – 37,8)		
Umidade relativa (%)		51,52 (15 – 90)		
Lux (lúmens)		11800 (615 – 94000)		

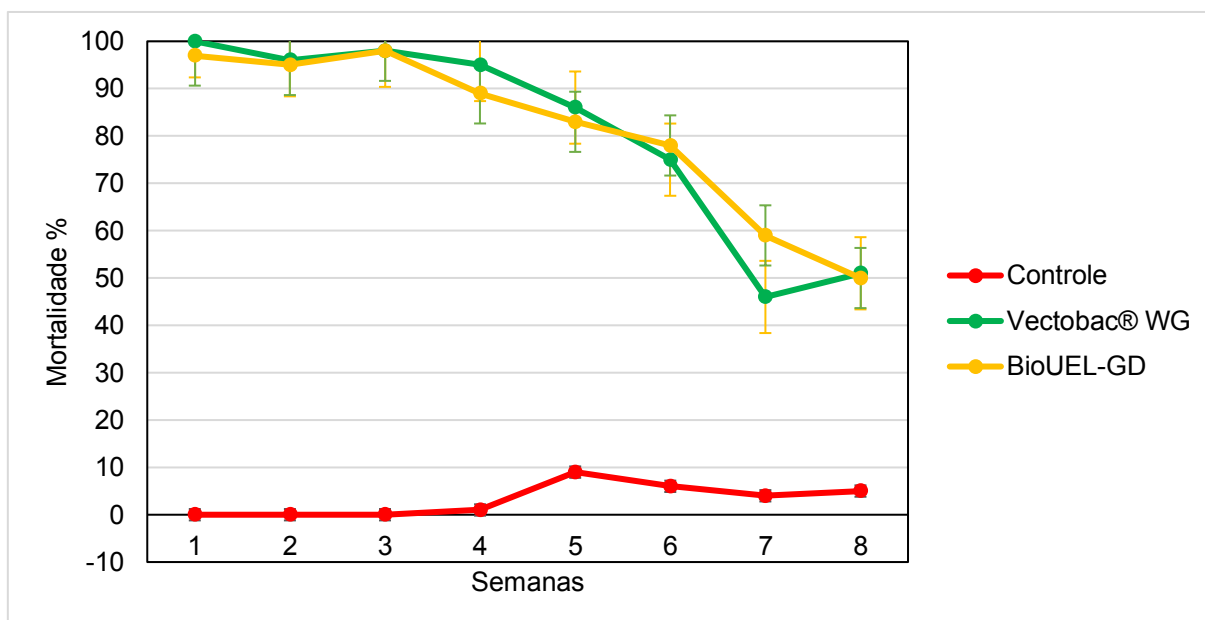
*As médias seguidas das mesmas letras (agrupamentos) não possuem diferença estatística de acordo com Kruskal-Wallis

Partindo do teste de Kurskal-Wallis, não há diferenças entre abióticos entre o controle e demais tratamentos, portanto, os formulados à base de Bti não alteram as propriedades abióticas da água quando aplicado (pH (p = 0,69964), temperatura da água (p = 0,5866), condutividade (p = 0,80721) e sólidos totais dissolvidos (p = 0, 91086).

A segunda etapa, foi a avaliação da formulação BioUEL-GD sobre larvas de e *Aedes*, à visualizar a influência sua propriedade de flutuação e liberação lenta sobre larvas desse gênero. O experimento aconteceu em comparação apenas com o produto padrão Vectobac® WG devido a semelhança de formulação em relação ao BioUEL-GD.

No controle, não houve uma mortalidade acima de 10%, sendo nos outros tratamentos, BioUEL-GD e VectoBac® WG, mantendo-se acima de 90% até a quinta semana, assim como na etapa anterior com a formulação em comprimido. A partir da sexta semana foi observado decréscimo na eficácia em ambas as formulações testadas (Figura 9).

Figura 9 – Média percentual da mortalidade das réplicas dos tratamentos e controle no período em relação às semanas decorrentes (S) nos tratamentos: controle, Vectobac® WG e BioUEL-GD larvas de *Aedes* em situação de campo simulado no período de oito semanas entre 15/10/2019 à 06/12/2019.



Essa segunda etapa com a formulação BioUEL-GD ocorreu com temperatura ambiente média de 26,46° C a qual houve uma relevante variação entre 16,4 – 40,8° C durante o período das oito semanas analisadas; umidade relativa de 51,52% e lux médio de 10260 lúmens. Os parâmetros abióticos da água não mostram diferença significativa entre os tratamentos e o controle a partir de Kruskal-Wallis tanto para pH ($p = 0,93994$), temperatura da água ($p = 0,97578$), condutividade (0,12171) e sólidos totais dissolvidos ($p = 0,14482$), evidenciando novamente a não alteração dos parâmetros a partir da composição dos formulados (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos Denguetech®, Vectobac® WG e BioUEL-GD em situação de campo com larvas de *Aedes* no período de oito semanas entre 15/10/2019 à 06/12/2019.

	Controle	Vectobac® WG	BioUEL-GD
pH	8,34 a (6,91 – 11,76)	8,46 a (7,34 – 11,61)	8,43 a (7,26 – 11,78)
Temperatura da água (°C)	25,10 a	25,09 a	24,49 a

	(18,01 – 29,35)	(17,96 – 29,57)	(17,93 – 29,29)
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	68,42 a (58 - 80)	68,44 a (58 – 78)	67,7 a (56 – 89)
TDS (mg/L)	33,98 a (31 – 40)	34,07 a (29 – 39)	33,79 a (29 – 45)
Temperatura atmosférica (°C)		26,46 (16,4 – 40,8)	
Umidade relativa (%)		52,5 (15 – 95)	
Lux (lúmen)		10260 (328 – 86000)	

*As médias seguidas das mesmas letras (agrupamentos) não possuem diferença estatística de acordo com Kruskal-Wallis

Melo-Santos *et al.* 2001 realizaram testes com uma nova formulação em comprimido à base de Bti desenvolvida por Far-Manguinhos-Fiocruz, chamada C4P1, em condição de campo com larvas de *Aedes* em situação similar. O formulado experimental testado teve uma eficácia inicial entre 93 a 100% com persistência de mais de 7 semanas em ambientes sombreados com mortalidade atingindo de 90% das larvas.

As duas formulações, BioUEL-C e BioUEL-GD, mostraram eficácias similares em relação à persistência e mortalidade, Becker (2000) argumenta a considerável eficácia de formulações em comprimidos ou pastilhas em relação a outras formulações para o controle de *Ae. aegypti*, sobretudo, corroborado por Ritchie *et al.* 2010.

Ritchie *et al.* 2010 realizaram bioensaios com megadoses do formulado Vectobac® WG para *Ae. aegypti* em condições de campo afim de avaliar se uma dosagem maior é realmente significativa para o controle larval. Os testes mostraram que a aplicação de 10, 20 e 50 vezes mais que o recomendado manteve a eficácia de mais de 90% por 8, 8 e 23 semanas respectivamente. Os experimentos realizados em condição de campo com BioUEL-C e Vectobac® WG, aplicando a concentração recomendada manteve-se acima de 90% até cinco semanas, onde uma megadose do produto pode não ser monetariamente viável em relação aos resultados.

3.2.2 *Culex*

Os ensaios em condições de campo com larvas de *Culex* tiveram a

duração total de dez semanas. O experimento ocorreu com temperatura ambiente média de 23,78° C (mínimo 12,3 – máximo 35,6) umidade relativa média de 61% (17 – 95) e luminosidade 4190,37 lúmens (102 – 93900).

Quanto às condições da água ao longo do experimento no tratamento controle o pH médio foi de 8,42, temperatura da água de 23,07° C, a condutividade foi de 101,14 $\mu\text{S cm}^{-1}$, o TDS foi de 52,30 mg/L. Aplicando Kruskal-Wallis para comparação das médias entre controle e tratamentos Vectobac® WG e BioUEL-GD não houve diferença significativa entre os parâmetros abióticos dentre os tratamentos onde para pH $p = 0,95569$; temperatura da água $p = 0,98982$; condutividade $p = 0,99854$ e; TDS $p = 0,71548$ (Tabela 4).

Tabela 5 – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre tratamentos controle e produtos, Vectobac® WG e BioUEL-GD em situação de campo com larvas de *Culex* no período de dez semanas entre 18/03/2019 à 23/05/2019.

	Controle	Vectobac® WG	BioUEL pó
pH	8,42 a (6,64 - 10,15)	8,31 a (6,93 - 9,77)	8,18 a (4,65 - 9,71)
Temperatura da água (°C)	23,07 a (19,66 - 27,21)	22,78 a (19,26 - 26,3)	22,83 a (13,34 - 26,52)
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	101,14 a (45 - 134)	85,95 a (41 - 124)	87,71 a (57 - 126)
TDS (mg/L)	52,30 a (24 - 68)	44,65 a (22 - 63)	45,81 a (30 - 66)
Temperatura atmosférica (°C)		23,78 (12,3 - 35,6)	
Umidade relativa (%)		61,04 (17 - 95)	
Lux (lúmen)		4190,37 (102 - 93900)	

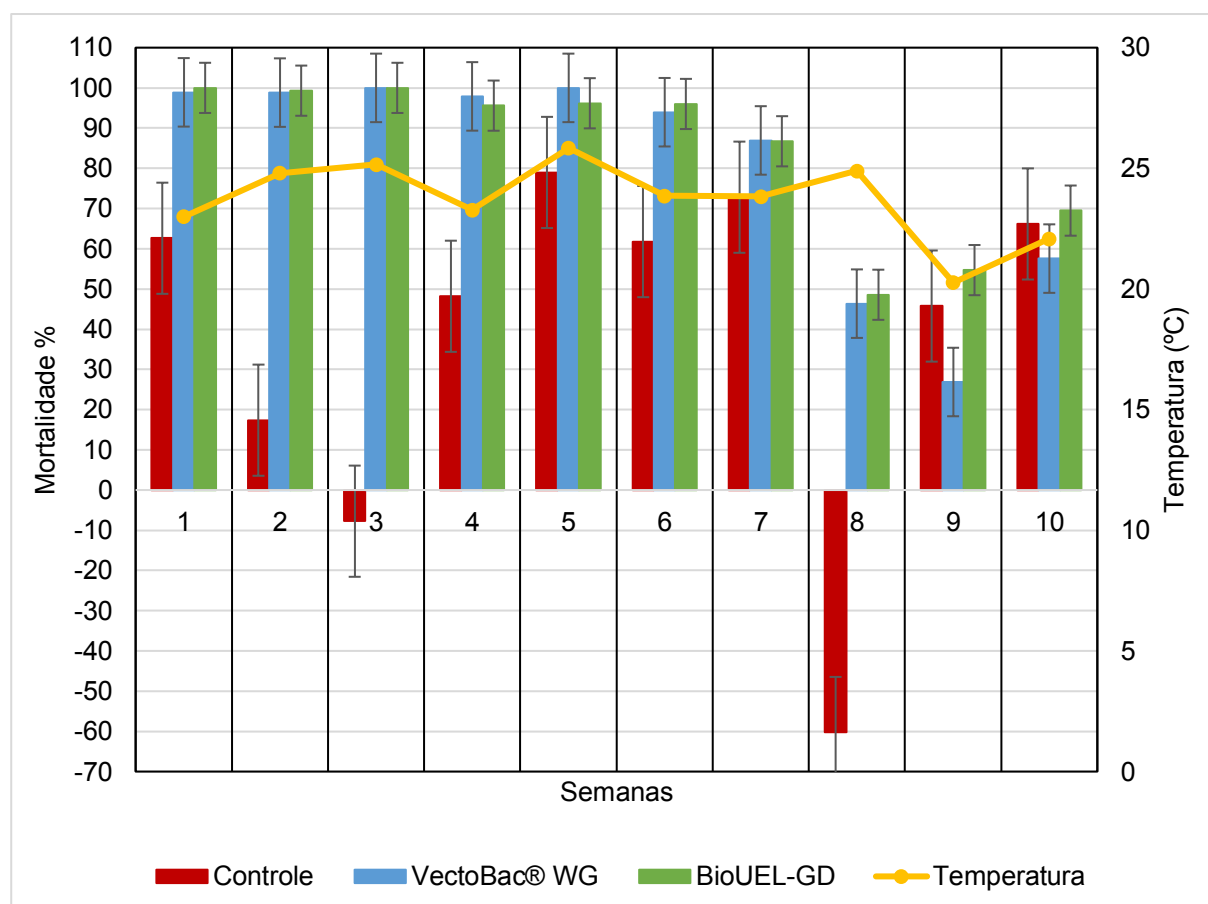
*As médias seguidas das mesmas letras (agrupamentos) não possuem diferença estatística de acordo com Kruskal-Wallis.

As médias de mortalidade das dez semanas foram: Controle = 38,56% (-60,8 – 78,96); Vectobac® WG = 80,72% (26,86 - 100); BioUEL-GD = 84,65% (48,56 – 100). No teste t de Student não ocorreu diferença significativa entre as médias de mortalidade entre os formulados à base de Bti ($p = 0,2741$).

O experimento, em ambos os produtos testados se mantem de forma equivalente. Até a sexta semana, os índices de mortalidade estavam acima de 90%, a partir da sétima semana ambos os produtos BioUEL-GD e VectoBac® WG

apresentam redução da eficiência (Figura 10).

Figura 10 – Média percentual da taxa de diminuição populacional semanal das larvas de *Culex* expostas três tratamentos: controle Vectobac® WG e BioUEL-GD, e temperatura média semanal sob condições de campo no período de dez semanas entre 18/03/2019 à 23/05/2019.



O experimento ocorreu em situação sombreada, onde recebia sol direto em alguns pontos por poucos minutos ao dia, influência que pode ter sido primordial para a uma efetividade significativa por sete semanas, nos experimentos anteriores com *Aedes*. Diversos autores apontam a associação da radiação solar com à desnaturação das proteínas, a fotolabilidade (Lacey, 2007; Boukedi *et al.* 2016), ao qual pode ser um fator relevante para a perda da efetividade dos formulados, de acordo com os experimentos de Melo-Santos *et al.* 2001.

Experimentos em relação à luz solar direta e sombreado de Melo-Santos *et al.* 2001 indica redução relevante da atividade da formulação experimental C4P1 de 40-54 dias em situação sombreada para 13-35 dias em condições de luz

solar.

A grande variação populacional, tanto a diminuição quanto o aumento chamam atenção, sobretudo no controle no qual ocorreu variação populacional em média percentual de 38,56%, e intervalo mínimo de -60,8% que corresponde ao aumento populacional em relação ao início da semana e, quanto máximo de 78,96% de diminuição populacional ao final de 72h. Para avaliar a normalidade desses dados se fez uma análise da média de todas as semanas em número de larvas e seus intervalos de confiança (Figura 11).

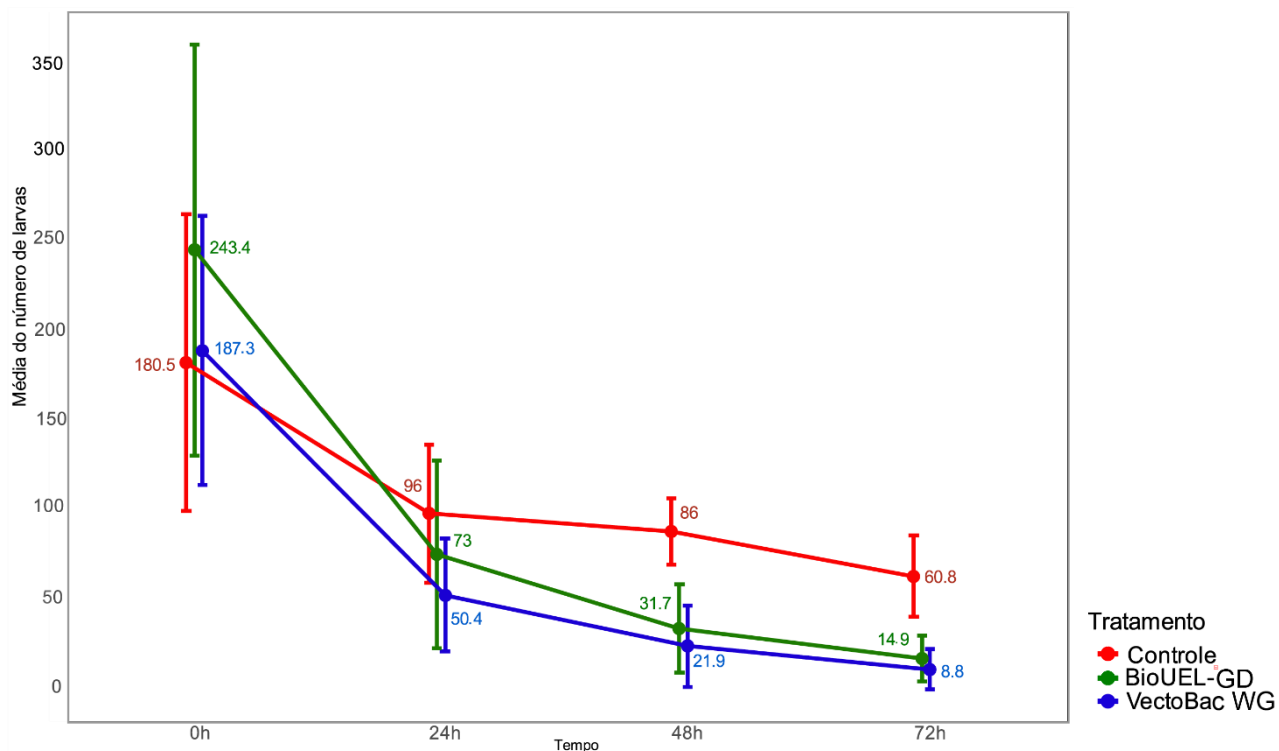
Observa-se então que ao início da semana, com lotes variados e de números aleatório de larvas, todos os tratamentos, Controle, Vectobac® WG e BioUEL-GD se encontram todos compartilhando o intervalo de confiança, no qual em 24h, é visível uma leve tendência a distinção do controle em relação aos tratamentos dos formulados. Em 48h há distinção total dos intervalos de confiança, que ilustra a normalidade das variações populacionais e ação dos produtos nos tratamentos aplicados.

Essa variação na flutuação populacional no controle pode ter relação direta com a temperatura. O experimento teve uma variação significativa de 12,3° C a 35,6° C, o que influencia no desenvolvimento e comportamento das larvas (Milby & Meyer, 1986; Kilpatrick *et al.* 2008). A Figura 10 ilustra essa relação, onde maiores temperaturas como a semana 2 (24,8 1° C) e semana 3, (25,1° C) apresentam uma maior diminuição populacional, assim como na semana 8 a qual houve o aumento de 60,28% em relação ao início da semana com a temperatura em 24,9° C.

Situação diferente quanto às menores temperaturas, a qual com a pequena baixa de 23° C na semana 1, 23,7° C na semana 4, tanto quanto nas semanas 9 e 10 com 20,3 e 22,1° C respectivamente demonstrando maior diminuição populacional nesses momentos (62,6%, 48,2%, 45,7% e 66,2% respectivamente).

Outro ponto que chama atenção nessa relação de temperatura para com a flutuação populacional de larvas foi a semana 5, onde houve a maior diminuição populacional de larvas, 78,96%, e a maior temperatura média, 25,8° C. Nesta mesma semana foi onde houve a maior temperatura absoluta registrada do experimento, com intervalo de 20,9 – 25,1° C ao decorrer da semana.

Figura 11 – Média da flutuação populacional a cada 24 horas das dez semanas decorrentes do experimento quanto ao número de larvas coletadas dos tratamentos Controle, BioUEL-GD e Vectobac® WG com seus intervalos de confiança quanto a normalidade da variação populacional do período entre 18/03/2019 à 23/05/2019.



3.2.2.1 Análise microbiológica

A presença do Bti foi monitorada durante todo o experimento em todos os recipientes semanalmente para analisar a dinâmica das colônias em condições de campo para *Culex*. Em 540 placas de Petri inoculadas com amostras semanais da superfície e do fundo das caixas d'água foram analisadas e contabilizadas as unidades formadoras de colônias (UFC) ao decorrer das semanas nos recipientes em situação simulada de campo.

Os resultados correspondem à 10 mL da água coletada para cada amostra, sendo assim 0,002% do volume total de 500 L dos recipientes. Quantidade de UFCs acima de 1000 não foram contabilizadas e utilizam a notação 1000+.

O Vectobac® WG possui uma formulação granulosa e que se dispersa na água quando aplicado, o que gera, possivelmente uma concentração

maior no fundo do recipiente. Sendo o BioUEL-GD um formulado desenvolvido para manter-se em suspensão, se espera exatamente ao contrário do Vectobac® WG, que sua concentração maior de bactéria esteja na superfície e distribuição lenta ao decorrer do tempo para mais ao fundo do recipiente.

Os resultados apontaram para situação distinta da esperada (Tabela 6). O Vectobac® WG nas primeiras semanas se mostrou bem disperso nas camadas testadas, sendo na primeira semana chegando a 1000+ UFCs tanto na superfície quanto no fundo, enquanto na segunda semana já começa a mostrar tendência das células a descenderem para o fundo do recipiente, diminuindo para uma média de 562 UFCs na superfície e no fundo se mantendo na situação anterior. Essa situação continua progressivamente durante o período de observação, permanecendo elevada concentração de células no fundo ao decorrer das semanas, exceto na décima semana a qual apresentou uma concentração de células significativas de 283,11, ao que não se mostrou nas duas semanas que se antecedeu, que não houve detecção na superfície (Figuras 8 e 9).

Para BioUEL-GD a situação foi similar, esperava-se uma prevalência maior das células na superfície, por sua característica flutuante, mas já na primeira semana de experimentação no fundo houve uma média de 741,5 UFCs em relação à superfície de 554,67, mas sobretudo a partir da terceira semana. Ao decorrer de todas as semanas este padrão se manteve de maior concentração ao fundo, mas mantendo um número significativo em relação ao Vectobac® WG na superfície (Figuras 12 e 13).

Tabela 6 – Médias das amostras das réplicas do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) de Bti em experimento em situação de campo para larvas de *Culex* em caixas d'água na superfície (Sup.) e fundo (Fun.) dos tratamentos controle e formulados Vectobac® WG e BioUEL-GD ao decorrer das dez semanas (Sem.) no período de 18/03/2019 à 23/05/2019.

Sem.	Controle		Vectobac® WG		BioUEL-GD	
	Sup.	Fun.	Sup.	Fun.	Sup.	Fun.
1	0	0	1000+	1000+	554,67	741,5
2	0	0	562	1000+	317,11	761,78
3	0	0	0,67	4	12,44	356,11
4	0	0	5,67	8,44	4,44	717,67
5	0	0	2,11	7,33	385,78	1000+
6	0	0	1,56	8,33	42,22	491,56

7	0	0	1,89	9,22	476	499,67
8	0	0	0	0	34,56	1000+
9	0	0	0	6,33	131,22	465
10	0	0	283,11	1,77	57,44	560,11

Figura 12 – Unidades formadoras de colônias de Bti em meio LB com 100µL/mL de ampicilina inoculadas com amostras da água dos recipientes do experimento em condições de campo para larvas de *Culex* coletadas na superfície e fundo ao fim da primeira semana de atividade dos formulados BioUEL-GD e VectoBac® WG. Amostras da superfície do (A) Controle, (B) BioUEL-GD e (C) Vectobac® WG. Amostras do fundo do recipiente (D) Controle, (E) BioUEL-GD e (F) Vectobac® WG.

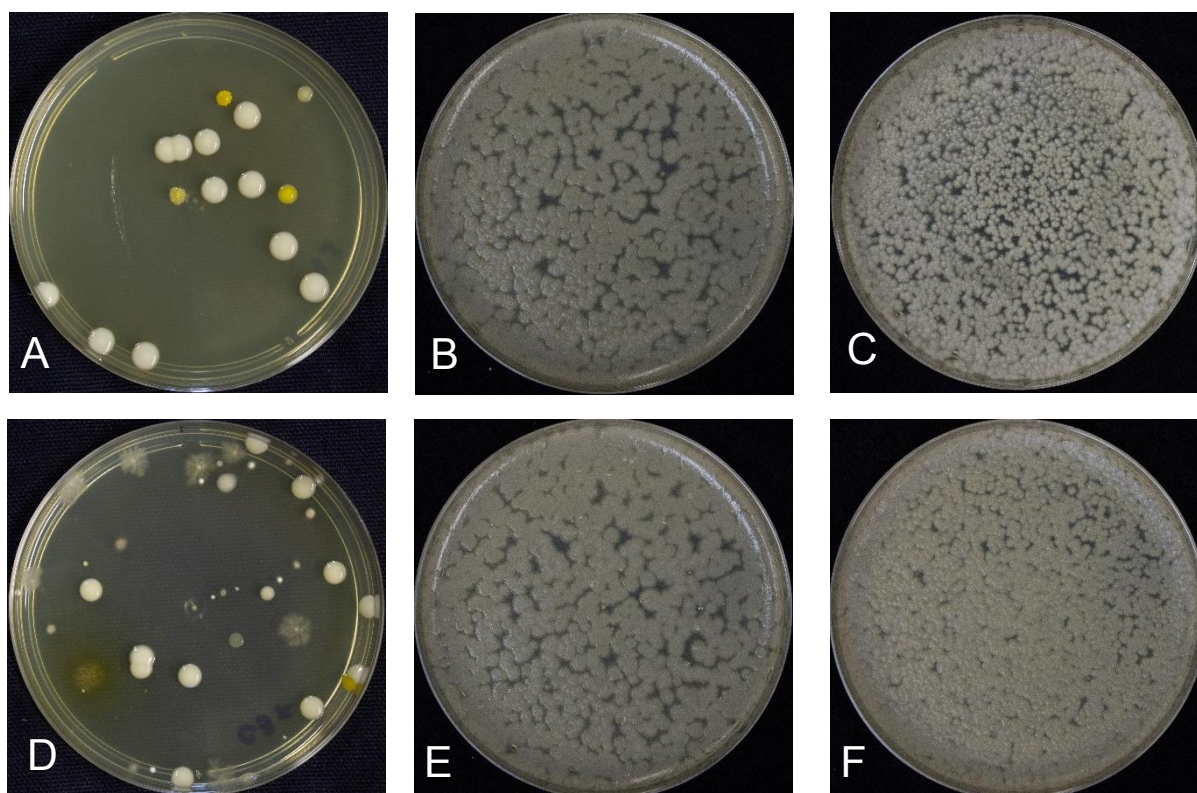
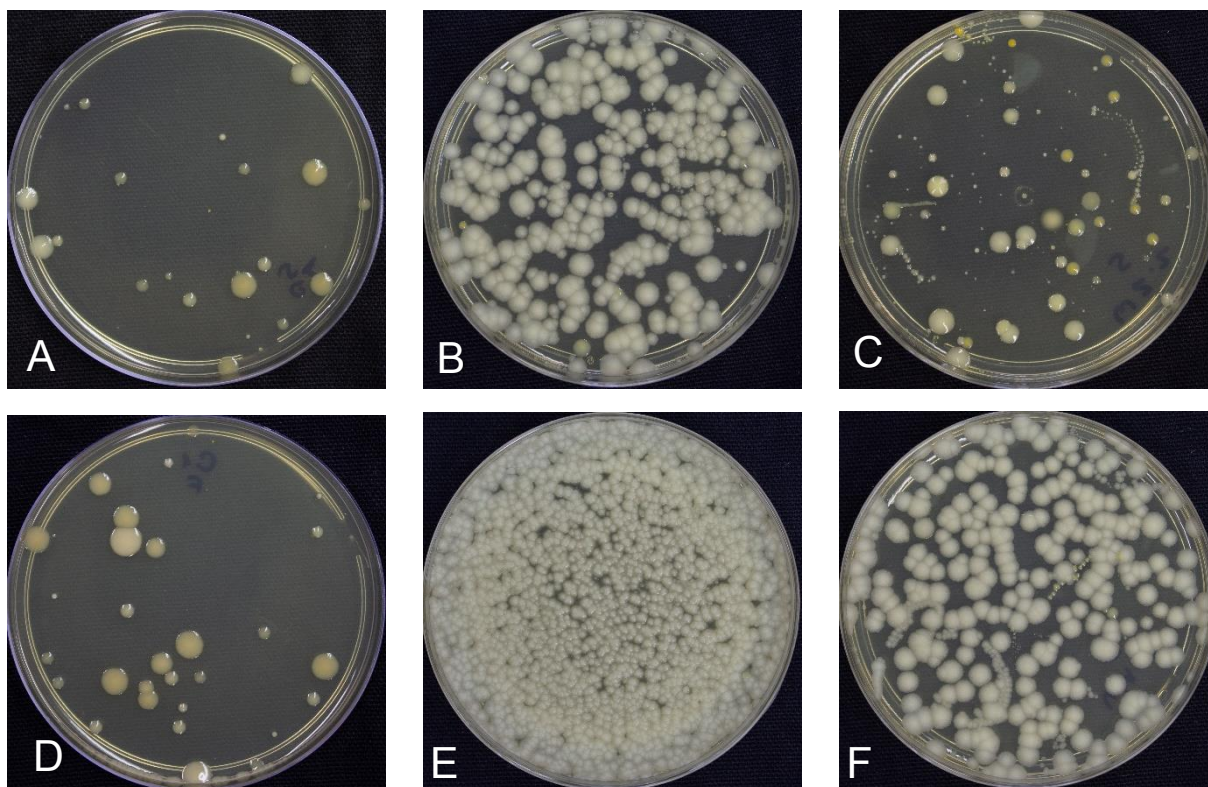


Figura 13 – Meio LB com 100 µL/mL de ampicilina inoculadas com amostras da água dos recipientes do experimento em condições de campo para larvas de *Culex* coletadas na superfície e fundo ao fim da décima semana de atividade dos formulados BioUEL-GD e VectoBac® WG. Amostras da superfície do (A) Controle, (B) BioUEL-GD e (C) Vectobac® WG. Amostras do fundo do recipiente (D) Controle, (E) BioUEL-GD e (F) Vectobac® WG.



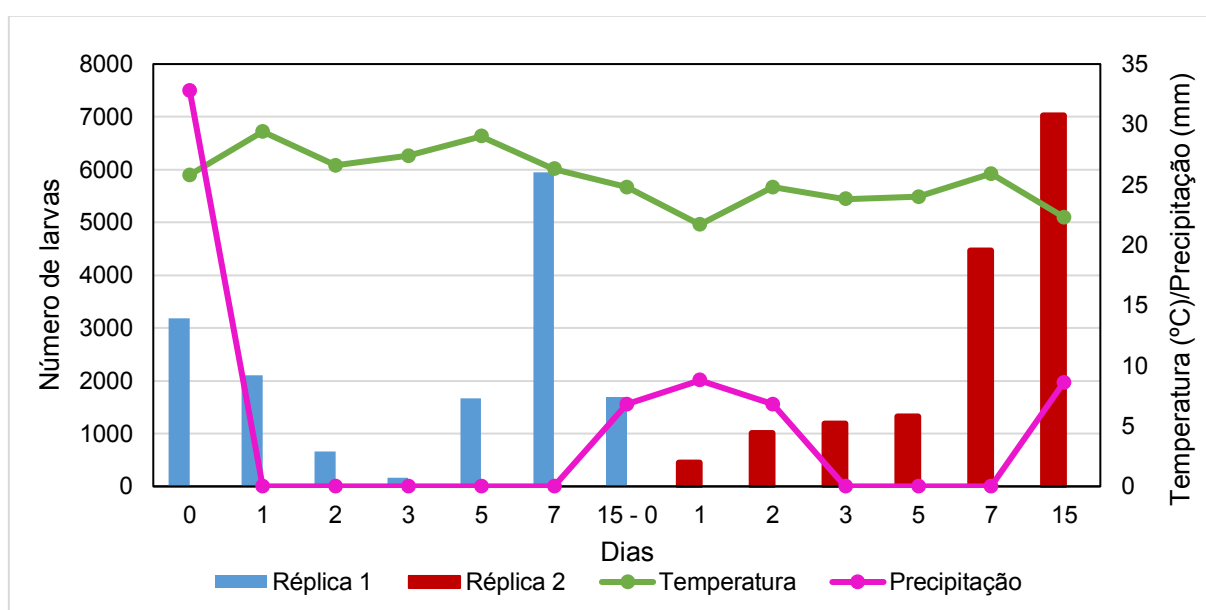
3.3 CAMPO

O experimento em campo ocorreu em local aberto e suscetível a intempéries naturais e de rejeitos da empresa na qual se localizava. A população inicial da lagoa, somando-se os seis pontos amostrais, foi de 3182 larvas a partir da metodologia adotada. Após a aplicação do BioUEL-GD em toda a borda da lagoa, onde houve uma diminuição populacional de 33,7% nas primeiras 24 horas. No segundo dia houve a diminuição populacional de 79,07% e no terceiro dia o ápice de 94,97% (Figura 14). Nas análises a partir do quinto dia com 47,74%, com a população larval inicia o processo de reestabelecimento e colonização da lagoa.

Na segunda repetição, a população inicial corresponde ao décimo quinto dia da primeira réplica. Esta população corresponde a 1693 espécimes, e com

a reaplicação do BioUEL-GD, houve o decréscimo de 73,36%, havendo um pequeno aumento no segundo, terceiro e quinto dia, mas mantendo-se abaixo do número em relação à população inicial com 4,28%, 29,71% e 21,74% respectivamente (Figura 14).

Figura 14 – Número total de larvas da lagoa de tratamento de efluentes colonizada por larvas de *Culex* amostrada sob aplicação do formulado BioUEL-GD em relação à temperatura (°C) e precipitação (mm), com duas réplicas de 15 dias o período de 29/10/2019 à 27/11/2019.



O experimento aconteceu com uma temperatura média de 26,94 C, com intervalos entre 14,6 a 37,9° C, e umidade relativa de 44,87%, entre 15 e 95%. Em relação aos parâmetros abióticos houve uma variação significativa de pH, com intervalos entre 5,07 a 11,58 por todo o experimento. Outros parâmetros que chamam atenção é a condutividade e TDS, como mostra a Tabela 7, mas isso se justifica pelo aporte variável de dejetos da empresa na lagoa durante o período alterando as variáveis.

Em relação à temperatura média diária e a precipitação média, de acordo com o Instituto Agrônomo do Paraná localizado à 13 km da área estudada, com a relação de mortalidade, o produto foi aplicado na primeira repetição após haver precipitação média de 32,8 mm, mantendo-se sem chuva até o sétimo dia, fato que pode ter ajudado no controle mais efetivo. Na segunda aplicação, houve precipitação desde a aplicação, até o dia dois, fator esse que pode ter auxiliado no

carreamento mecânico do formulado e também das larvas por escoamento e conseqüentemente, diminuindo a taxa de mortalidade até o dia 5, como foi na primeira réplica (Figura 14).

Tabela 7 – Médias dos parâmetros abióticos e valores mínimos e máximos entre as duas réplicas de aplicação do formulado BioUEL-GD em lagoa de tratamento de efluentes em campo com larvas de *Culex* entre 29/10/2019 à 27/11/2019

	Réplica 1	Réplica 2
pH	7,19 (5,07 - 8,92)	9,39 (7,94 - 11,58)
Temperatura da água (°C)	30,87 (21,59 - 34,44)	31,02 (26,76 - 34,19)
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	2021 (1087 - 2999)	2879,52 (2111 - 3958)
TDS (mg/L)	911,44 (492 - 1486)	1292,71 (975 - 1728)
Temperatura atmosférica (°C)	28,11 (18,3 - 37)	25,77 (14,6 - 37,9)
Umidade relativa (%)	44,75 (15 - 91)	45 (15 - 95)

As formas imaturas de *Culex* ocorrem frequentemente em ambientes aquáticos com alta taxa de matéria orgânica (Clements 1999). Lagoas de tratamento de efluentes com aporte diário de rejeitos se tornam ambiente propício para o desenvolvimento de mosquitos desse gênero, assim como a lagoa trabalhada (Ali *et al.* 1989; Mulligan & Schaeffer, 1990).

A efetividade do BtiUEL-GD foi satisfatória na concentração aplicada em até 5 dias de atividade, diferentemente dos experimentos anteriores em situações de campo. Alguns autores fazem referência ao alto aporte de matéria orgânica ao qual pode reduzir a eficácia devido à maior presença de matéria em suspensão a qual pode absorver as proteínas do Bti (Boisvert & Boisvert, 2000; Lacey, 2007), além de maior opção alimentar em suspensão (Gaugler & Molloy, 1980).

Entretanto, a alimentação por filtração pode resultar em maior ingestão do Bti suspenso (Fry-O'Brien & Mulla, 1996; Dawson *et al.* 2019), algo que foi avaliado por Zequi *et al.* 2014 com o bioinseticida à base de Bti AquaBac® XT que possui projeção de manter-se em suspensão em solução por um tempo maior a

qual obteve taxa máxima de controle em 2 L/Ha, propriedade principal do BioUEL-GD.

Outros problemas que podem reduzir a efetividade do Bti em lagoas de resíduos, além do fluxo de água e turbidez a qual leva gradativamente as proteínas mecanicamente pelo escoamento, substâncias depositadas podem degradar a toxina do Bti, tal qual o cloro, importante produto presente na água de abastecimento tanto quanto para limpeza (Sinegre *et al.* 1981; Rydzanicz *et al.* 2010).

Dessa forma, a aplicação em lagoas de tratamento de efluentes e resíduos se torna um caso mais específico e necessita de mais atenção e controle. A simples utilização de doses maiores, como mostra Mulla *et al.* (2003), pode não ser tão significativo para o controle de *Culex* em ambientes como este pois outros fatores, como aponta Lacey (2007), são relevantes para a eficiência do Bti como temperatura, radiação solar, vegetação e outros aspectos mencionados anteriormente como turbidez e estratégias e taxas de alimentação das larvas.

4 CONCLUSÃO

As formulações se mostram estáveis, sem causar alterações na qualidade da água a partir dos fatores abióticos.

Os comprimidos formulados (BioUEL-C) são eficientes no controle de *Aedes* para criadouros contendo até 10 litros de água, sendo um excelente produto para controle do vetor, podendo ser usado nas ações integradas de combate ao *Aedes*, em até cinco semanas.

O formulado em grânulos dispersíveis (BioUEL-GD) se mostra tão efetivo quanto outros produtos comerciais, em concentrações menores inclusive, servindo como alternativa em comparação a semelhantes no mercado, e mais saudável, tanto à saúde humana e ambiental, em relação as alternativas mais comuns como inseticidas químicos para usos de sete semanas em reservatórios de médio porte com presença de larva de *Culex*. Em locais abertos, com fluxo de água e aporte de matéria, alta densidade larval como *Culex*, com o BioUEL-GD é necessário em conjunto com o controle de fatores abióticos para postergar a atividade, mas é efetivo para o tratamento até sete dias, ou mais em condições ideais.

Sendo assim, a proposta dessas formulações é uma alternativa viável de tecnologia nacional estável e eficaz para o controle de mosquitos para o uso da população e órgãos governamentais de maneira simples e segura.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.F.P.M., SOUZA, W.V., ARAÚJO, T.V.B., BRAGA, M.C., MIRANDA-FILHO, D.B., XIMENES, R.A.A., MELO FILHO, D.A., BRITO, C.A.A., VALONGUEIRO, S., MELO, A.P.L., BRANDÃO-FILHO, S.P., MARTELLI, C.M.T., Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. **Cad. Saúde Pública**, 2018
- ALI, A.; WEAVER, M.S.; COTSENMAYER, E. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Vectobac 164 JOURNAL OF THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION VOL. 26, NO. 2 12 AS) and *Bacillus sphaericus* 2362 (ABG-6232) against *Culex* spp. mosquitoes in a dairy lagoon in Central Florida. **Fla Entomol** 72:585–592. 1989.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ANGELO, E. A., VILAS-BÔAS, G. T., CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, p. 269-293, 2002.
- ARAÚJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS, S. O.; RIOS, E. M. M.; REGIS, L. Evolution of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *Israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, 41, 339-347. 2007
- ARAÚJO, Y.C.; ROQUE, R.A.; ZEQUI, J.A.C.; TADEI, W.P. Controle de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linneus, 1762) (Diptera: Culicidae) aclimatados em diferentes temperaturas e níveis de gás carbônico utilizando *Bacillus thuringiensis israelenses*, *Saccharopolyspora spinosa* e Pyriproxyfen. **Anais do 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Maceió. 2016
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Springer, Dordrecht, p. 383-398. 2000.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014.
- BENEDICT, M. ROBINSON, A.S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.349-355, ago. 2003.
- BERMUDI, P.M.M. et al. Criadouro de *Aedes aegypti* em reservatório subterrâneo de água da chuva: um alerta. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], Universidade de Sao

Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. v. 51, p.122-128, 2017.

BERNATE, C.; MEYER, J. Análise da distribuição espaço-tempo do mosquito *Aedes aegypti* geneticamente modificado. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 5, n. 1, 2017.

BESERRA, J.M.T, SANTANA, I.N.S., MIRANDA, J.P., TADEI, W.P., & PINHEIRO, V.C.S. Breeding Sites of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae): Study about the containers in dry and rainy seasons in Dengue-endemic city. **Revista de Pesquisa em Saúde**, 18(2), 102-107. 2017.

BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYUDHAN, R.; ROBERTS, B.; HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Trop Med Int Heal**. 18(5):564-77. 2013.

BOISVERT, M. BOISVERT, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. **Biocontrol Sci Technol** 10:517–561. 2000.

BOUKEDI, H.; TOUNSI, S.; ABDELKEFI-MESRATI, L. Abiotic factors affecting the larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin against the lepidopteran pest *Ephestia kuehniella*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 123(2), 59–64. 2016.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiol Serv Saude**. 16(4):295-302. 2007.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342. 2006.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Dengue – instruções para pessoal de combate ao vetor. **Manual de normas técnicas**. Brasília: Funasa; 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília: Ministério da Saúde; 32 p. 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília: Ministério da Saúde; (Série A. Normas e Manuais Técnicos.) 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil - LIRAA**: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a

Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 49, n. 59, p.1-14, jan. 2019a.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Recomendações para Manejo da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas. **Nota Informativa Nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS**, Brasília, mai. 2019b.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 50, n. 34, p.1-16, jan. 2020.

BRAVO, A. Biodiversity of Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* and evolution of resistance to these toxins in different insect pests. **Toxicon**, [s.l.], v. 149, p.98-107, 2018.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Amsterdam, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, London, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

BRITO, L.P.; LINSS, J.G.B.; LIMA-CAMARA, T.N.; BELINATO, T.A.; PEIXOTO, A.A.; LIMA, J.B.P.; VALLE, D. MARTINS, A.J. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60878, 2013.

BRUSCA, R.C., MOORE, W., & SHUSTER, S.M. **Invertebrados**. 3^oed. Rio de Janeiro: Guanabar Koogan. 2018.

BOUAZIZ, A.; AMIRA, K.; DJEGHADER, N.E.; AÏSSAOUI, L.; BOUDJELIDA, H. Impact of an insect growth regulator on the development and the reproduction potency of mosquito. **J. of Entom. and Zoo. Stud**, v. 5, n. 3, p. 1662-1667, 2017.

BOCCOLINI, D.; TOMA, L.; LUCA, M.; SEVERINI, F.; ROMI, R.; REMOLI, M.E.; SABBATUCCI, M.; VENTURI, G.; REZZA, G.; FORTUNA, C. Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 35, 2016.

CABRAL, E.K.F.; GOMES, G.C.; SANTOS, H.H.; MACIEL, S.S. Efeito Ventilatório da Fisioterapia Intensiva na Síndrome de Guillain-Barré sob Ventilação Mecânica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.11-16, 30 jul. 2012

CARDOSO, C.A.A., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., CODEÇO, C.T., MOTTA, M.A. Mosquitoes in Bromeliads at Ground Level of the Brazilian Atlantic Forest: the relationship between mosquito fauna, water volume and plant type. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 108, 449 – 458. 2015.

CAVALCANTI, K.R., TAUIL, P.L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, 26(3), 617-620. 2017.

CHAVES, L.F., HAMER, G.L., WALKER, E.D., BROWN, W.M., RUIZ, M.O., KITRON, U.D. Climatic variability and heterogeneity impact urban mosquito diversity and vector abundance and infection. **Ecosphere**, 2, 1 – 21. 2011.

CLEMENTS AN. **The biology of mosquitoes**. Volume 2. Sensory reception and behaviour. New York: CABI Publishers. 1999.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora FIOCRUZ: Rio de Janeiro. 1994.

COSTA, M. A. R. **A Ocorrência do *Aedes aegypti* na Região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí** (Dissertação de Mestrado Institucional em Geografia) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade Estadual de Educação Ciências e Letras de Paranavaí, Presidente Prudente, 2001.

DAWSON, D.; SALICE, C.J.; SUBBIAH, S. The Efficacy of the *Bacillus thuringiensis israelensis* Larvicide Against *Culex tarsalis* in Municipal Wastewater and Water from Natural Wetlands. **Journal Of The American Mosquito Control Association**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.97-106, jun. 2019.

DEPOLI, P.A.; ZEQUI, J.A.C.; NASCIMENTO, K.L.C.; LOPES, J. Eficácia de Ovitampas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. **Entomobrasilis**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.51-55, 29 abr. 2016.

DUTRA, H.L.C.; ROCHA, M.N.; DIAS, F.B.S; MANSUR, S.B.; CARAGETA, E.P.; MOREIRA, L.A. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.771-774, jun. 2016.

FERNANDES, R.S. CAMPOS, S.S.; RIBEIRO, P.S.; RAPHAEL, P.S.; BONALDO, M.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Culex quinquefasciatus* from areas with the highest incidence of microcephaly associated with Zika virus infections in the Northeast Region of Brazil are refractory to the virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 577-579, 2017.

FIGUEIRÓ, A.C.; SÓTER, A.P.; BRAGA, C.; HARTZ, Z.M.A.; SAMICO, I. Análise da lógica de intervenção do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Rev Bras Saude Matern Infant**. 10 Supl 1:S93-106. 2010.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp; v. 2, 864 p. 2002.

FORATTINI, O.P.; MASSAD, E. Culicidae vectors and anthropic changes in a southern Brazil natural ecosystem. **Ecosystem Health**, v. 4, n. 1, p. 9-19, 1998.

FOSTER, W.A.; WALKER, E.D. Mosquitoes (Culicidae). **Medical And Veterinary Entomology**, [s.l.], p.261-325, 2019.

FRY-O'BRIEN, L.L.; MULLA, M.S. Effect of tadpole shrimp, *Triops longicaudatus* (Notostraca: Triopsidae), on the efficacy of the microbial control

agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in experimental microcosms. **J Am Mosq Control Assoc** 12:33–38. 1996.

GAUGLER, R, MOLLOY, D. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Environ Entomol** 9:704–708. 1980.

GOMES, A.S.; SCIAVICO, C.J.S.; EIRAS, A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Rev Soc Bras Med Trop**, Belo Horizonte, 39(4): p.327-332, jul. 2006.

GUEDES, M.L.P. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecol. Aust.**, 16, 283 – 296. 2012.

GUEDES, D.R.D. PAIVA, M.H.S.; DONATO, M.; BARBOSA, P.P.; KROKOVSKY, L.; ROCHA, S.W.S. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

HARBACH, R.E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, 1668, 591 – 638. 2007.

HARBACH, R. E., & KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, 23(4), 327–370. 1998

IBM CORP. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2019.

JIGGINS, F.M. The spread of Wolbachia through mosquito populations. **Plos Biology**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.1-6, 1 jun. 2017.

LACEY, L. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association** 23, 133– 163. 2007.

LIMA-CAMARA, T.N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública**. 50:36. 2016.

LINSS, J.G.B. BRITO, L.P.; GARCIA, G.A.; ARAKI, A.S.; BRUNO, R.V., LIMA, J.B.P.; VALLE, D.; MARTINS, A.J. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 25, 2014.

LIU, Z.; ZHOU, T.; LAI, Z.; ZHANG, Z.; JIA, Z. ZHOU, G.; WILLIAMS, T.; XU, J.; GU, J.; ZHOU, X.; LIN, L. YAN, G.; CHEN, X. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.1085-1091, jul. 2017.

LOPES, J.; ARIAS, J.R.; YOOD, D.C. Evidências preliminares de estratificação vertical de postura de ovos por alguns Culicidae (Diptera) em floresta no município de Manaus – Amazonas. **Acta amazônica**, v.13, p. 431-439. 1983.

LOPES, T.B.F. **Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) na cidade de Londrina - PR**. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **TRENDS in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

MACHI, A.R. **Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril**. 2019. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MALTA, J.M.A.S.; VARGAS, A. LEITE, P.L.; PERCIO, J. COELHO, G.E.; FERRARO, A.H.A.; CORDEIRO, T.M.O.; DIAS, J.S.; SAAD, E. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** [online]. v. 26, n. 01. 2017.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98, 703-708. 2003.

MARQUES, M.S. Mosquitos Invasores Na Europa E Importância Da Sua Vigilância Em Portugal. **Revista Ibero-americana de Saúde e Envelhecimento**, Évora, v. 3, n. 3, p.1088-1105, dez. 2017.

MARTINS, V.E.P., ALENCAR, C.G., KAMIMURA, M.T., ARAÚJO, F.M.C., SIMONE, S.G., DUTRA, R.F., & GUEDES, M.I.F. Occurrence of Natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Plos One**, 2012.

MEDEIROS-SOUSA, A.R., CERETTI-JUNIOR, W., URBINATTI, P.R., NATAL, D., CARVALHO, G.C., PAULA, M.B., FERNANDES, A., HOMEM DE MELO, M.H.S., OLIVEIRA, R.C., ORICO, L.D., GONÇALVES, E.F.B., & MARRELLI, M.T. Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I. **Biota Neotropica**. 13(1), 2013.

MELO-SANTOS, M.A.V.; SANCHES, E.G.; JESUS, F.J.; REGIS, L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 859-860, 2001.

MILBY, M.M.; MEYER, R.P. The influence of constant versus fluctuating water temperatures on the preimaginal development of *Culex tarsalis*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 2(1):7-10. 1986.

MOLYNEUX, D. H. Patterns of change in vector-borne diseases. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.91, n.7, p. 827-39. 1997.

MONNERAT, R.G.; SOARES, C.M.; SANTOS, M.A.; OLIVEIRA, C.; CARDOSO, C.; LIMA, L.H.C.; PRAÇA, L.B.; MARTINS, E.S.; DUMAS, V.F.; QUEIROZ, P.R.M.; RAMOS, F.R.R.; SUJII, E. Controle de larvas de *Aedes aegypti* através da utilização de *Bacillus thuringiensis* em São Sebastião (DF), Brasil. **Universitas: Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.115-120, 17 dez. 2012

MONTAGNER, F.R.G., SILVA, O.S., JAHNKE, S.M. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban áreas. **Brazilian Journal of Biology**, 78(2), 233-239. 2018.

MYERS, P.S.; YOUSTEN, A.A. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1205-1211, 1980.

MULLA, M.S.; DARWAZEH, H.A.; DAVIDSON, E.W.; DULMAGE, H.T.; SINGER, S. Atividade larvicida e eficácia de campo de cepas de *Bacillus sphaericus* contra larvas de mosquitos e segurança para organismos não-alvo. **Mosquito News** 44: 336-42. 1984.

MULLIGAN, F.S.; SCHAEFER, C.H. Efficacy of a juvenilehormone mimic, pyriproxyfen (S-31183), for mosquito-control in dairy waste-water lagoons. **J. Am Mosq Control Assoc** 6:89–92. 1990.

NOBREGA, M.E.B.; ARAÚJO, E.L.L.; WADA, M.Y.; LEITE, P.L.; DIMECH, G.S.; PERCIO, J. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** [online]. v. 27, n. 2. 2018.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A.C.C.; AZEVEDO, E.B.; GARCIA, B.O.; SANTOS, S.F.; AGUIAR, R.W.S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus, (Díptera: Culicidae) **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.2, n.2: p. 37 - 43, 2011.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2019

RAMIREZ, J.; GARVER, L.; DIMOPOULOS, G. Challenges and Approaches for Mosquito Targeted Malaria Control. **Current Molecular Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.116-130, 1 mar. 2009

REIS-CASTRO, L.; HENDRICKX, K. Winged promises: Exploring the discourse on transgenic mosquitoes in Brazil. **Technology In Society**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.118-128, maio 2013.

RESENDE, M.; GAMA, R. Persistence and efficacy of growth regulator pyriproxyfen in laboratory conditions for *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39 (1): 72-75. 2006.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, 856 p. 2001.

RITCHIE, S.A.; RAPLEY, L.P.; BENJAMIN, S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1053-1059, 2010.

RYDZANICZ, K.; SOBCZYŃSKI, M. GUZ-REGNER, K. Comparison of the activity and persistence of microbial insecticides based on *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in organic polluted mosquito-breeding sites. **Pol J Environ Stud** 19:1317–1323. 2010.

RUEDA, L.M. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. **Fresh Anim Divers Assessm**, 595, 477 – 487. 2008.

SANTOS, D.G. **Importância da participação popular nas estratégias de controle da dengue no Brasil**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) - Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2016

SCHWARTZ, J.L.; LU, Y.J.; SÖHNLEIN, P.; BROUSSEAU, R.; LAPRADE, R.; MASSON, L.; ADANG, M. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. **FEBS letters**, v. 412, n. 2, p. 270-276, 1997.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington: [s.n.], v. 62, p. 775-806, 1998.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; LIRA, K.S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical** 27:51-63, 1998.

SILVA, W.R. et al. Oviposição de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em ovitrampas com diferentes atrativos. In: 15º SICONBIOL - SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2017, Ribeirão Preto. **Anais do 15º Siconbiol**. Ribeirão Preto: Sociedade Entomológica do Brasil, 2017

SILVEIRA, M. P. **Aplicação do Biomonitoramento para Avaliação da Qualidade da água em rios**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna. 2004.

SINEGRE, G.; GAVEN, B.; VIGO G. Contribution to standardization of laboratory tests on experimental and commercial formulations of the serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. II—influence of temperature, free chlorine, pH, and water depth of biological activity of primary powder. **Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol** 19:149–155. 1981.

TAUIL, Pedro Luiz. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99-S102, 2001.

TORRES-QUINTERO, M.C. GÓMES, I. PACHECO, S. SÁNCHEZ, J. FLORES, H. OSUNA, J. MENDOZA, G. SOBERÓN, M. BRAVO, A. Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, 21 mar. 2018.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 101, n. 1, p. 1-16, 2009.

VEGA-RÚA, A., ZOUACHE, K., GIROD, R., FAILLOUX, A.B., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya vírus. . **Journ Virol**, 88(11), 6294-6306. 2014.

VILAS-BOAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 6, p. 673-687, 2007.

WHO - World Health Organization. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. Geneve: World Health Organization; 1996

WHO - World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. Communicable disease control, Prevention and eradication, WHO pesticide evaluation scheme. WHO, Geneva WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. 2005

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit, **Mosquito Identification Resources**. <http://www.wrbu.org/>, 2019.

ZARA, A.L.S.A. SANTOS, S.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZEQUI, J. A. C.; BOAS, G.T.V.; MARQUES, F.A.; SANTOS, F. P; SILVA, B.P.; SILVA, M.A.N. Formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* para controle de *Aedes* Meigen, 1818 (Culicidae) em condições simuladas de campo, Londrina, Paraná. In: 15 Simposio de Controle Biológico, 2017, Ribeirão Preto. **Anais do 15 Simposio de Controle Biológico**. Curitiba: SEB, v. 1. p. 1-1. 2017.

ZEQUI, J.A.C., LOPES, J., MEDRI, I.M. Imaturos de Culicidae (Diptera) encontrados em recipientes instalados em mata residual no município de Londrina, Paraná, Brasil. **Rev. Bras. de Zool.**, 22, 656 – 661. 2005.

ZEQUI, J.A.C.; LOPES, J. Biological control of *Culex* (*Culex*) *saltanensis* Dyar, (Diptera, Culicidae) through *Bacillus thuringiensis israelensis* in laboratory and field conditions. Revista Brasileira de Zoologia, [s.l.], v. 24, n. 1, p.164-168, mar. 2007.

ZEQUI, J.A.C.; LOPES, J.; SANTOS, F.P. Controle de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Através de Formulados Contendo *Bacillus thuringiensis israelensis* em Temperaturas Controladas. **Entomobrasilis**, Vassouras, v. 4, p.130-134, 2011.

ZEQUI, J.A.C.; LOPES, J.; SANTOS, F.P.; VILAS-BÔAS, G.T. Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated field conditions. **International Journal of Mosquito Research**. 2:5-9. 2015.

ZEQUI, J.A.C.; SANTOS, F.P.; LOPES, J. Control of *Culex quinquefasciatus* and *Cx. saltanensis* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus thuringiensis israelensis* in wastewater treatment lagoons. **Revista Colombiana de Entomología** 40: 98-103. 2014.